

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018

Matea Vuković  
952/BPI

Strategija uzgoja organizama koji  
akumuliraju fosfor podešavanjem  
koncentracije natrijeva acetata

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vode na Zavodu za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr.sc. Marina Matošića, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Vlade Crneka, mag. ing. i doc. dr. sc. Josipa Ćurka.

## **ZAHVALA**

Veliko hvala mojem mentoru prof. dr. sc. Marinu Matošiću, na stručnim savjetima, potpori i strpljenju pri izradi ovog rada.

Također se zahvaljujem asistentu Vladi Crneku, mag. ing. i doc. dr. sc. Josipu Ćurku na pomoći i savjetima kod izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Hvala i mojoj obitelji i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom studiranja i izrade diplomskog rada.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vode

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### STRATEGIJA UZGOJA ORGANIZAMA KOJI AKUMULIRAJU FOSFOR PODEŠAVANJEM KONCENTRACIJE NATRIJEVA ACETATA

Matea Vuković 952/BPI

**Sažetak:** U ovom radu praćen je rast i aktivnost organizama koji akumuliraju fosfor (PAO) u laboratorijskom SBR uređaju uzgajanih na sintetičkoj vodi različite koncentracije natrijeva acetata kao izvora ugljika. Pokus je proveden u ciklusima od 6h s izmjenom anaerobne i aerobne faze, a uvjeti rada bili su prilagođeni rastu PAO-a (prosječno  $T=13,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $\text{pH}=8,1$ ). Cilj rada je bio istražiti optimalne uvjete vođenja procesa za uzgoj aktivnog mulja s visokom učinkovitosti uklanjanja fosfora pri višim koncentracijama acetata, odnosno ispitati može li se postupnim povećanjem koncentracije natrijeva acetata prilagoditi aktivni mulj za rad na višim koncentracijama acetata. Tijekom pokusa praćeni su parametri poput uklanjanja ugljika, fosfora i dušika, a za ispitivanje biološke aktivnosti PAO-a provedeno je devet testiranja tijekom uzgoja. Rezultati su pokazali da visoke koncentracije acetata nemaju negativni utjecaj na rast i aktivnost PAO-a ako se proces obrade vode provodi u kratkim ciklusima u trajanju od 6 h, te da takav način vođenja procesa i postupno povećavanje koncentracije acetata dovodi do povećanja udjela PAO-a u aktivnom mulju i učinkovitosti uklanjanja fosfora.

**Ključne riječi:** mikroorganizmi koji akumuliraju fosfor (PAO), natrijev acetat, fosfor, uzgoj

**Rad sadrži:** 51 stranica, 17 slika, 5 tablica, 72 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Marin Matošić

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Josip Ćurko, Vlado Crnek, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Marin Matošić*
2. Doc.dr.sc. *Josip Ćurko*
3. Prof.dr.sc. *Tibela Landeka Dragičević*

**Datum obrane:** 25. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Water Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology *or* Biotechnology *or* Nutrition

### STRATEGY OF CULTIVATION OF POLY-PHOSPHATE ACCUMULATING ORGANISMS BY INCREASING OF NATRIUM ACETATE CONCENTRATION

*Matea Vuković 952/BPI*

**Abstract:** *In this paper growth and activity of poly-phosphate accumulating organisms (PAO), in a laboratory SBR on synthetic wastewater and with different sodium acetate concentration as a carbon source, were observed. Experiment was conducted in 6 h treatment aerobic/anaerobic cycles with adjusted conditions to promote the growth of PAO (average  $t=13,2$  °C,  $pH=8.1$ ). The aim of this work was to investigate the optimal process managing conditions for activated sludge cultivation with high efficiency of phosphorus removal at higher acetate concentrations, and to investigate whether the activated sludge can be adjusted to work at higher acetate concentrations by a gradual increase in sodium acetate concentration. During the experiment, parameters such as carbon, phosphorus and nitrogen removal were monitored and nine tests of biological activity of PAO were performed. The results showed that high acetate concentrations will not have a negative influence on PAO activity in short water treatment process cycles that last up to 6 h, and that such a method of managing the process and gradually increasing acetate concentration leads to an increase in PAO's in activated sludge and phosphorus removal efficiency.*

**Keywords:** *poly-phosphate accumulating microorganisms (PAO), sodium acetate, phosphorus, cultivation*

**Thesis contains:** 51 pages, 17 figures, 5 tables, 72 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Marin Matošić, Full professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Josip Ćurko, Vlado Crnek, mag. eng.*

**Reviewers:**

1. PhD. *Marin Matošić*, Full professor
2. PhD. *Josip Ćurko*, Assistant professor
3. PhD. *Tibela Landeka Dragičević*, Full professor

**Thesis defended:** 25 September 2018

# Sadržaj

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
2.1	OTPADNE VODE .....	3
2.1.1	<i>Podrijetlo otpadnih voda i onečistila u otpadnim vodama.....</i>	<i>3</i>
2.1.2	<i>Fosfor u otpadnim vodama.....</i>	<i>4</i>
2.1.3	<i>Eutrofikacija .....</i>	<i>4</i>
2.2	NAPREDNO BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA (EBPR).....	5
2.3	ORGANIZMI KOJI AKUMULIRAJU FOSFOR (PAO).....	8
2.3.1	<i>Biokemijski procesi.....</i>	<i>8</i>
2.3.2	<i>Mikrobiologija.....</i>	<i>9</i>
2.3.3	<i>Kompeticija PAO-GAO .....</i>	<i>11</i>
2.4	UTJECAJ PARAMETARA NA UČINKOVITOST EBPR PROCESA.....	11
2.4.1	<i>Izvor ugljika.....</i>	<i>11</i>
2.4.2	<i>pH-vrijednost.....</i>	<i>12</i>
2.4.3	<i>Temperatura .....</i>	<i>13</i>
2.4.4	<i>Ostali parametri .....</i>	<i>13</i>
2.5	ISTRAŽIVAČKA PITANJA I RADNE HIPOTEZE .....	14
<b>3</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>16</b>
3.1	OBRADA SINTETIČKE OTPADNE VODE U LABORATORIJSKOM SBR UREĐAJU .....	16
3.2	KARAKTERISTIKE I SASTAV SINTETIČKE OTPADNE VODE .....	19
3.3	ODRŽAVANJE I MJERENJE TEMPERATURE .....	20
3.4	MJERENJE pH-VRIJEDNOSTI.....	20
3.5	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE OTOPLJENOG KISIKA.....	21
3.6	ODREĐIVANJE UKUPNE SUSPENDIRANE TVARI (TSS), UKUPNE ORGANSKE SUSPENDIRANE TVARI (VSS) I UKUPNE ANORGANSKE TVARI (ISS) .....	21
3.7	ODREĐIVANJE INDEKSA MULJA (SVI) .....	22
3.8	ODREĐIVANJE KEMIJSKE POTROŠNJE KISIKA (KPK).....	22
3.9	ODREĐIVANJE UKUPNOG FOSFORA (TP) .....	23
3.10	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE OTOPLJENOG FOSFORA.....	23
3.11	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNOG DUŠIKA (TN) .....	24
3.12	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NITRATA.....	24
3.13	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE AMONIJAKA.....	24
3.14	MIKROSKOPIRANJE UZORKA AKTIVNOG MULJA .....	25

3.15	ODREĐIVANJE MAKSIMALNE BRZINE ANAEROBNOG OTPUŠTANJA FOSFORA, MAKSIMALNE SPECIFIČNE BRZINE ASIMILACIJE KPK I NETO UKLONJENOG FOSFORA.....	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>27</b>
4.1	TESTIRANJA AKTIVNOSTI PAO-A.....	37
4.2	MIKROSKOPIRANJE AKTIVNOG MULJA .....	42
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>45</b>



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Matea Vuković

# 1 UVOD

Područje zaštite okoliša pred društvo stavlja velike izazove i obveze. Posebna pozornost usmjerena je očuvanju prirodnih vodenih sustava. Kako bi se očuvala prirodna ravnoteža potrebno je otpadnu vodu vratiti u okoliš u stanju što sličnijem početnom. Otpadne vode uglavnom su bogate organskim ugljikom, spojevima s dušikom i fosforom, a njihovo ispuštanje u vodene sustave može izazvati eutrofikaciju. Danas taj pojam upućuje na nepovoljan odgovor ekosustava prilikom kojeg dolazi do odumiranja fotosintetskih organizama, a time i do narušavanja prirodne ravnoteže. Upravo zato se obrada otpadnih voda nameće kao važna obveza društva.

Obrada otpadnih voda može se provoditi fizikalnim, kemijskim i biološkim načinom. Biološka obrada je, zbog svoje ekonomičnosti i efikasnosti, najprimjenjivija metoda. Ona obuhvaća biološke postupke u kojima se djelovanjem mikroorganizama (aktivni mulj) uklanjaju otopljeni organski i anorganski sastojci, te suspendirane čestice preostale nakon primarne obrade. Do sada su biološka postrojenja uglavnom uklanjala organske sastojke (biooksidacija) i dušik (nitrifikacija i denitrifikacija), no u posljednje vrijeme zakonske regulative zahtijevaju i uklanjanje fosfora. Fosfor je bitan gradbeni element života. Nenadomjestiv je u suvremenoj poljoprivredi i trenutačno dolazi do rasipanja i gubitaka fosfora u svakoj fazi životnog vijeka, što povećava zabrinutost zbog buduće opskrbe fosforom te zagađenja voda i tla.

Najčešće korištena biološka metoda uklanjanja fosfora je napredna biološka metoda uklanjanja fosfora (engl. *enhanced biological phosphorus removal*, EBPR). EBPR se temelji na procesu ugradnje fosfora u biomasu, a provodi se u anaerobnim i u aerobnim uvjetima uz pomoć mikroorganizama koji akumuliraju fosfor (engl. *poly-phosphate accumulating organisms*, PAO). Anaerobna i aerobna faza obrade mogu se provoditi u zasebnim reaktorima ili u dijelu ciklusa sekvencijskog šaržnog reaktora (engl. *sequencing batch reactor*, SBR)

U ovom radu, u laboratorijskom SBR uređaju, praćen je uzgoj PAO-a tijekom obrade sintetičke otpadne vode (influent) s različitim koncentracijama natrijeva acetata (izražen kao KPK vrijednost). Postoje indikacije u literaturi da visoke koncentracije natrijeva acetata smanjuju učinkovitost biološkog uklanjanja fosfora, te je cilj ovog rada istražiti može li se postupnim povećavanjem koncentracije natrijeva acetata prilagoditi aktivni mulj na visoku

koncentraciju acetata i visoku učinkovitost uklanjanja fosfora. Također, pokušati će se odrediti i optimalni uvjeti za EBPR pri obradi otpadne vode s visokim koncentracijama acetata.

## 2 TEORIJSKI DIO

### 2.1 Otpadne vode

#### 2.1.1 Podrijetlo otpadnih voda i onečistila u otpadnim vodama

Porastom broja stanovništva i širenjem industrijske proizvodnje problem nastajanja otpadnih voda i čvrstog otpadnog materijala postaje sve veći. U većini slučajeva takav otpad se izravno ispušta ili odlaže u okoliš i prirodne vodene sustave uzrokujući nepoželjne pojave u okolišu. Otpadne vode mogu potjecati iz industrije, kućanstava, stočnih uzgajališta i odlagališta smeća.

Industrijske otpadne vode su različitog sastava, ovisno o tipu procesa. Dije se dvije osnovne grupe: otpadne vode u kojima su prisutni biološko lako razgradljivi sastojci (npr. prehrambena i fermentativna industrija) i otpadne vode s teško razgradljivim biološkim sastojcima (npr. kemijska, farmaceutska, celulozna industrija). U kućanskim odnosno komunalnim otpadnim vodama sastav ovisi o sustavu opskrbe i odvodnje te o načinu življenja i klimatskim uvjetima. U takvim vodama ne postoje veće promjene kakvoće odnosno koncentracije osnovnih sastojaka. Vode koje potječu s farmi sadrže visoke koncentracije topljivih organskih i anorganskih sastojaka, posebno visoke koncentracije dušikovih i fosforinih spojeva koji otežavaju njeno pročišćavanje. Otpadne vode odlagališta sadrže različite sastojke koji su teško biološki razgradivi. Takve vode nastaju onečišćavanjem padalina ili podzemnih voda koje se cijede preko odlagališta čvrstog materijala različitog podrijetla. Vode koje se mogu smatrati uvjetno otpadnim vodama su oborinske i rashladne vode. U tim vodama nisu prisutne značajne količine onečistila te se mogu izravno ispuštati u vodene tokove (Glancer-Šoljan i sur., 2001; Matošić, 2015).

Onečistila se u otpadnim vodama dijele na kemijska onečistila i biološka onečistila. U kemijska onečistila spadaju razgradivi organski sastojci poput ugljikohidrata, bjelančevina, i masti čija prisutnost u vodama uzrokuje smanjenje koncentracije otopljenog kisika, a time imaju negativan utjecaj na živu populaciju u vodenom ekosustavu. Hranjivi sastojci poput dušika i fosfora također spadaju u kemijska onečistila, te u većim koncentracijama u vodenom okolišu uzrokuju pojavu eutrofikacije. U otpadnim vodama se mogu naći i opasna onečistila koja imaju utjecaj na žive organizme uzrokujući promjenu genetičkog sastava te teško razgradljivi organski sastojci poput fenola, detergenata i sl., koji djeluju kao otrovi ili inhibitori za većinu mikroorganizama. Kemijska onečistila čine i plivajuće čestice (ulja, suspendirane

čestice), metali i topljivi anorganski sastojci ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  itd.). Biološkim onečistilima smatramo sve patogene mikroorganizme i viruse. Među njima se ističu: *Escherichia coli* i *Vibrio cholerae* za bakterije, te Hepatitis A za viruse (Glancer-Šoljan i sur., 2001).

#### 2.1.2 Fosfor u otpadnim vodama

Fosfor je jedan od najvažnijih sastojaka živih organizama, uključen je u važne fiziološke procese. Prirodno se javlja kao komponenta nekih magmatskih i sedimentnih stijena. Nalazi se u sastavu prirodnih voda te otpadnih voda i mulja. Fosfor se može smatrati onečistilom onda kada se nalazi u koncentracijama većim od 0,1 mg/L u vodenom okolišu (Wimawalansa i Wimawalansa, 2015). Razlog tome je uporaba gnojiva, te kućanski i industrijski otpad (Benammar i sur., 2015). Izvori fosfora su raznoliki. Prema Morse i sur. (1993) 23% je ljudskog podrijetla, 11% od deterdženata, 32% od stoke, 17% od gnojiva, 7% iz industrije i 10% iz drugih izvora. Što se tiče fosfornog opterećenja podrijetlom iz poljoprivrede, poznato je da se ortofosfati snažno vežu za čestice tla. Kada se koriste velike količine gnojiva, fosfor će se gomilati u gornjim slojevima tla i u konačnici isprati u podzemne vode. Isto tako kada se dosegne zasićenje fosfora u gornjim slojevima tla, dolazi do proboja fosfora na niže razine. U slučaju pojave visoke razine podzemnih voda može doći do povećanja koncentracije fosfora u podzemnim vodama s istodobnim prodorom na površinske vode (Beatens, 2000).

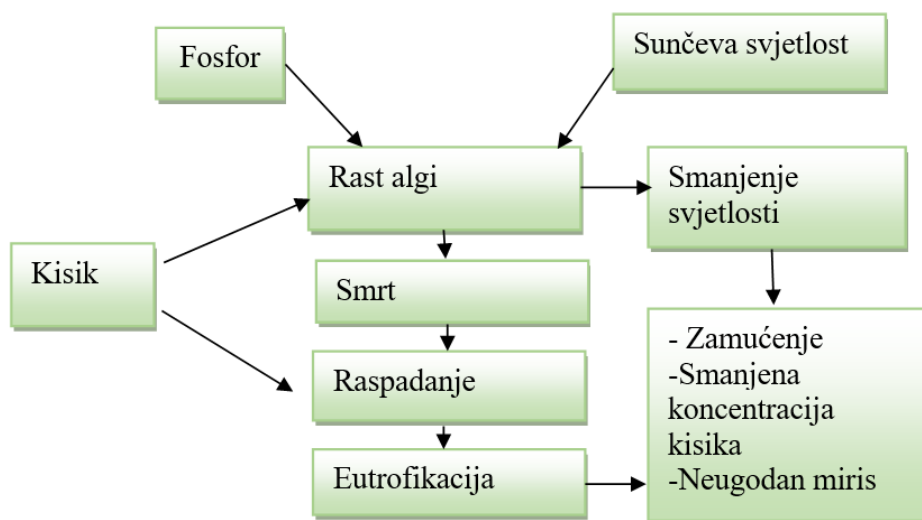
U otpadnim vodama fosfor se pojavljuje u tri oblika: fosfat (ortofosfat), polifosfat i organski fosfat. Ortofosfat je topljiv i može se naći u obliku fosforne kiseline i fosfatnih iona. Polifosfat je kondenzirani oblik fosfata koji je također topljiv u otpadnim vodama i ne može se istaložiti koagulantima. Organski vezani fosfat može se naći u dva oblika: topljivi koloidi koji se mogu taložiti i ukloniti zajedno s muljem i krute čestice koje se mogu hidrolizirati do ortofosfata. Ukupni fosfor (TP) u otpadnoj vodi tipično se kreće između 4 i 8  $\text{mgL}^{-1}$ , što uključuje 3 - 4  $\text{mgL}^{-1}$  fosfata, 2-3  $\text{mgL}^{-1}$  polifosfata i 1  $\text{mgL}^{-1}$  organski vezanog fosfata (Moore, 2009).

#### 2.1.3 Eutrofikacija

Koncentracija fosfora u prirodnim uvjetima je uravnotežena tj. dostupna masa udovoljava zahtjevima ekološkog sustava. Problem nastaje kada je ulaz fosfora u vode veći nego što ga populacija svih živih mikroorganizama ekosustava može asimilirati. Tada u vodama dolazi do pojave visokog sadržaja fosfora. Pojam eutrofikacije nekoć se koristio za pojavu visoke koncentracije biljnih hranjivih tvari posebice dušika i fosfora u vodenom okolišu. Danas

taj pojam upućuje na nepovoljan odgovor ekosustava s obzirom na pristup hranjivim tvarima (Harper, 1992). Povećano opterećenje voda hranjivim tvarima pospješuje rast fitoplanktona, cijanobakterija i makroalgi. Takav prekomjerni rast blokira sunčevu svjetlost da dopire do unutrašnjosti i time onemogućava rast fotosintetskih organizama, što može rezultirati odumiranjem tih organizama. Promjena u ravnotežnim omjerima hranjivih tvari dovodi do dominacije specifičnih vrsta i toksičnog cvjetanja algi. Iako su i dušik i fosfor limitirajući makronutrijenti odgovorni za rast, fosfor se smatra kritičnim jer cijanobakterije imaju sposobnost fiksacije dušika iz zraka. Učinak fosfora na eutrofikaciju prikazan je na slici 1.

Zadnjih desetljeća, eutrofikacija je postala globalno pitanje zbog povećanja broja stanovništva, obrade zemljišta i korištenja poljoprivrednih gnojiva. Također, eutrofikacija može biti problematična za ljudsko zdravlje ako se voda koristi kao izvor pitke vode. Kancerogeni potencijal nusproizvoda, koji nastaju dezinfekcijom u cilju sprječavanja nastanka eutrofičnih uvjeta u površinskim vodama, još je jedno pitanje koje bi trebalo razmotriti (Goel i Motlagh, 2014).



**Slika 1.** Utjecaj fosfora na pojavu eutrofikacije (Goel i Motlagh, 2014)

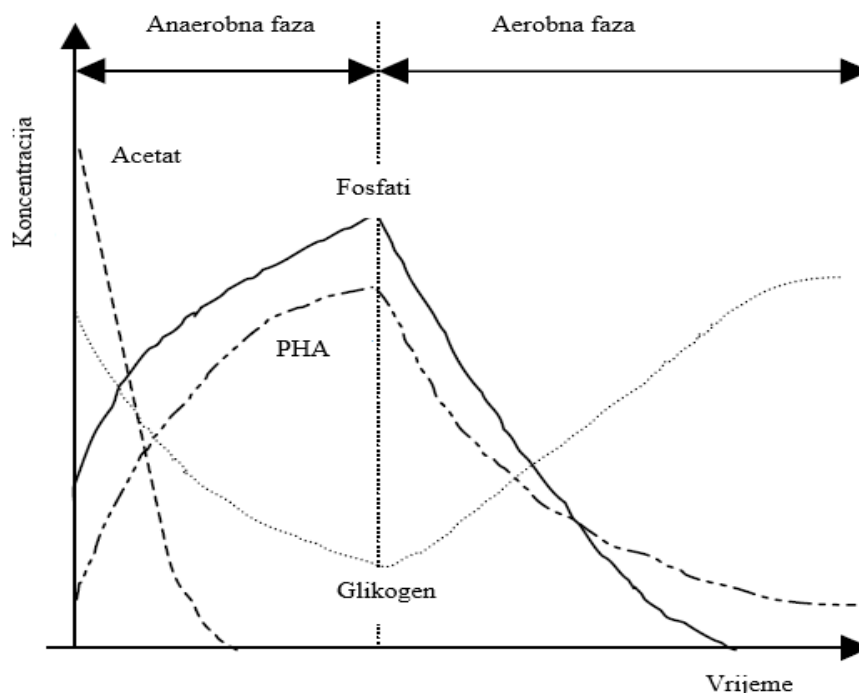
## 2.2 Napredno biološko uklanjanje fosfora (EBPR)

Biološka obrada otpadnih voda obuhvaća biološke procese u kojima mikroorganizmi iz otpadne vode uklanjaju otopljene organske (izvori ugljika i energije) i anorganske (izvori dušika i fosfora) sastojke, te suspendirane čestice zaostale nakon provedbe primarnih postupaka. U

provedbi bioloških postupaka obrade otpadne vode sudjeluju različite vrste mikroorganizama koji djeluju kao mješovita mikrobna zajednica zvana aktivni mulj (Glancer-Šoljan i sur., 2001).

Biološko uklanjanje fosfora se postiže procesom poznatim kao napredno biološko uklanjanje fosfora odnosno EBPR (engl. *enhanced biological phosphorus removal*). Taj se proces razvio i napredovao tijekom proteklih 50 godina, a danas se postrojenja s takvim načinom obrade vode koriste diljem svijeta (Seviour i sur., 2003). Ulazna otpadna voda u postrojenju za EBPR, nakon miješanja s povratnim aktivnim muljem, naizmjenično prolazi kroz anaerobnu i aerobnu zonu. Takvo kruženje mikrobne biomase zajedno s influentom kroz anaerobnu i aerobnu fazu dovodi do razmnožavanja organizama koji akumuliraju fosfor u aerobnoj fazi. Ti organizmi nazivaju se PAO (engl. *poly-phosphate accumulating organisms*). Osim što koriste fosfor za rast i održavanje, PAO koriste i velike količine ortofosfata koje akumuliraju unutar stanice u obliku polifosfata. Na kraju procesa se biomasa, zajedno s akumuliranim fosforom, uklanja iz sustava (Grady i sur., 1999).

U postrojenjima za biološko uklanjanje fosfora biomasa mora najprije proći kroz anaerobnu fazu, prije ulaska u aerobnu fazu ili anoksičnu fazu. Anaerobna faza, tj. faza bez prisutnosti kisika može se postići u zasebnom reaktoru ili u dijelu ciklusa sekvencijskog šaržnog reaktora (engl. *sequencing batch reactor*, SBR). Kada otpadna voda ulazi u anaerobnu fazu, bakterije koje akumuliraju fosfor (PAO) nakupljaju izvore ugljika u obliku unutarstaničnih polimera poli- $\beta$ -hidroksi-alkanoata (PHA). Energija za pohranu ovog polimera dobiva se razgradnjom glikogena i hidrolizom energijom bogatih unutarstaničnih polifosfata. Budući da se polifosfati hidroliziraju do ortofosfata, u tekućoj fazi oko mikroorganizama tijekom anaerobne faze povećava se koncentracija fosfata. Anaerobnu fazu treba slijediti faza bogata kisikom ili nitratima, tj. aerobna ili anoksična faza. Tijekom ove faze pohranjeni PHA se troši stvarajući energiju za rast, za unos ortofosfata iz tekuće faze, te za stvaranje energije i ugljika za nadoknađivanje glikogena i zaliha polifosfata. U takvim uvjetima smanjuje se koncentracija ortofosfata iz tekuće faze. Slika 2. prikazuje koncentracijske profile komponenata u EBPR-u pod anaerobnim i aerobnim uvjetima. Pod tim uvjetima se količina biomase, koja sadrži velike zalihe polifosfata, povećava i time se neto fosfor uklanja zajedno s otpadnim muljem (Beatens, 2000). Pokazano je da PAO može pohraniti do 10% polifosfata njihove suhe mase (Yeoman, 1988).



**Slika 2.** Koncentracijski profil komponenata u EBPR-u pod anaerobnim i aerobnim uvjetima (Beatens, 2000).

Uz napredno biološko uklanjanje fosfora postoji i kemijsko uklanjanje. Takav način obrade danas se rijetko koristi osim za obradu izlazne vode u kojoj je koncentracija ukupnog fosfora manja od  $1 \text{ mgPL}^{-1}$  (Janssen i sur., 2002). Prednosti i nedostaci biološkog uklanjanja fosfora u odnosu na kemijsko prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci biološkog uklanjanja fosfora u odnosu na kemijsko uklanjanje (Janssen i sur., 2002)

PREDNOSTI	NEDOSTATCI
Nema nastajanja kemijskog mulja koji se mora naknadno obrađivati	Ovisnost o sastavu otpadne vode
Dobra odvodnja viška mulja	Niža stabilnost i fleksibilnost procesa
Niži salinitet izlazne vode	Utjecaj na indeks mulja ( <i>engl. sludge volume index, SVI</i> )
Smanjena inhibicija denitrifikacijskih procesa (kod istovremenog uklanjanja N i P)	Otpuštanje fosfora u obradi mulja
Manje negativnih posljedica na uklanjanje ukupnog dušika	
Kvalitetniji mulj	

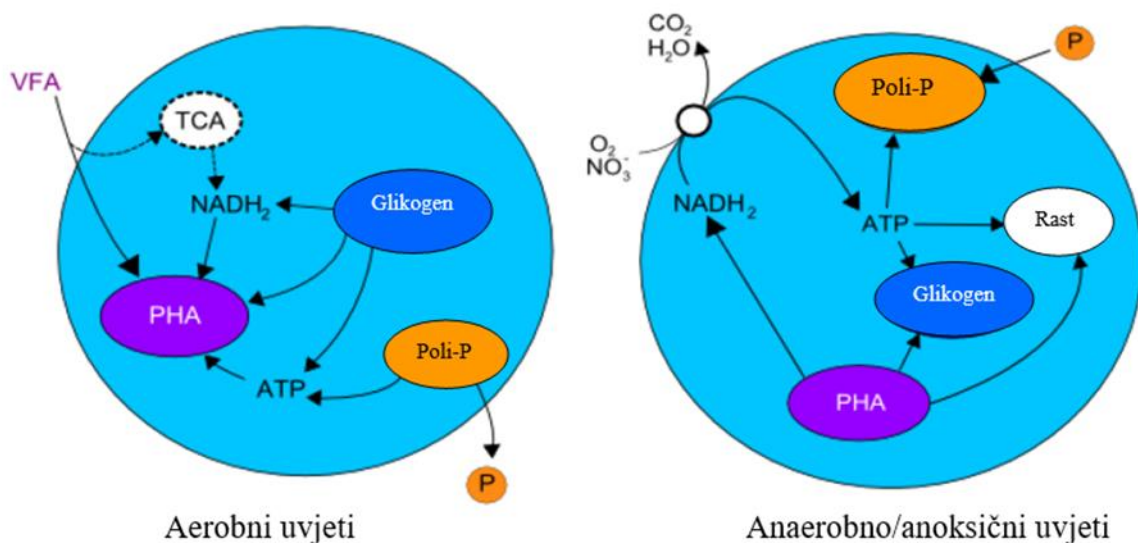


## 2.3 Organizmi koji akumuliraju fosfor (PAO)

### 2.3.1 Biokemijski procesi

Većina studija koja istražuju metabolizam PAO koriste acetat kao izvor ugljika jer je to najčešća hlapiva masna kiselina (*engl. volatile fatty acid*, VFA) prisutna u postrojenju za obradu otpadnih voda. U tim istraživanjima predloženi su različiti biokemijski modeli koji se razlikuju u određenim važnim aspektima. Većina biokemijskih modela se slaže oko pretvorbe acetata i fosfata u anaerobnoj fazi. Kada acetat uđe u stanice PAO-a, dolazi do njegove aktivacije uz utrošak energije ATP (*engl. adenosine triphosphate*, ATP) i nastaje acetil-CoA. ATP nastaje prijenosom energetske bogate fosfatne skupine s polifosfata na ADP (*engl. adenosine diphosphate*, ADP) kao i razgradnjom glikogena. Hidrolizom polifosfata nastaju kationi, poput  $K^+$  i  $Mg^{2+}$ , te  $H_2PO_4^-$  koji se oslobađaju u vanjski medij. Dvije molekule acetil-CoA se kondenziraju tako da tvore acetoacetyl-CoA, koji se reducira pomoću NADH (*engl. nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH) kako bi se formirao 3-hidroksibutiril-CoA. Nakon toga slijedi polimerizacija u poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB). Tip PHA koji se formira ovisi o tipu hlapive masne kiseline koju koriste PAO kao izvor ugljika. Najčešći polimeri PHA koje pohranjuju PAO su poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB), poli-hidroksivalerat (PHV) i poli- $\beta$ -hidroksi-2-metilvalerat (PH<sub>2</sub>MV).

U aerobnoj ili anoksičnoj zoni, PHA koji su formirani u anaerobnoj fazi oksidiraju se u CO<sub>2</sub> upotrebom kisika ili nitrata kao akceptora elektrona. Otpuštena energija se koristi za stvaranje polifosfata, glikogena i za rast novih stanica. Organizmi koji akumuliraju fosfat i koriste nitrat kao akceptor elektrona poznati su kao DPAO (*engl. denitrifying PAO*). Ti organizmi imaju sposobnost istovremenog uklanjanja fosfora i dušika (Seviour i sur., 2003; Oehmen i sur., 2007; van Loosdrecht i sur., 2016). Slika 3 shematski prikazuje pojednostavljene metaboličke procese PAO-a u aerobnim i anaerobnim uvjetima.



**Slika 3.** Shematski prikaz anaerobnog i aerobnog metabolizma PAO (Yuan i sur., 2012).

Glavna razlika između biokemijskih modela za EBPR je izvor reducirajućih koenzima za sintezu PHA u anaerobnom metabolizmu PAO (Zhou i sur., 2010). Neki modeli pretpostavljaju da je TCA ciklus (*engl. tricarboxylic acid*, TCA) odgovoran za osiguravanje reducirajućih koenzima, (Comeau i sur., 1986; Wentzel i sur., 1986) tj. da se acetil-CoA pretvara kroz TCA ciklus kako bi se dobio NADH. S druge strane, Mino i sur. (1987) su pretpostavili da reducirajući koenzimi nastaju razgradnjom glikogena glikolizom. Posljednjih desetljeća glikoliza je prihvaćena kao glavni izvor redukcijskih ekvivalenata za sintezu PHA iz VFA (Zhou i sur. 2010). Međutim, neka istraživanja pokazuju da PAO mogu koristiti i TCA ciklus i glikolizu kao izvor reducirajućih ekvivalenata (Pijuan et al., 2008, Zhou i sur., 2009). Provedena studija o aktivnosti TCA ciklusa (Lanham et al., 2013) pokazale su da ciklus TCA igra važnu ulogu u EBPR sustavima. Utvrđeno je da ograničena dostupnost glikogena potiče aktivnost TCA ciklusa. Također je utvrđeno da EBPR sustavi s većom aktivnošću glikolize pokazuju učinkovitije uklanjanje fosfora.

### 2.3.2 Mikrobiologija

Prva istraživanja mikrobiologije PAO-a navode da je *Acinetobacter spp.* jedini mikroorganizam odgovoran za EBPR (Fuhs i Chen, 1975). Međutim, većina današnjih istraživanja tvrde da niti jedna bakterija nije dominantna u mulju i da nema potpuno metaboličke i morfološke karakteristike PAO, te se smatra da PAO uključuju nekoliko različitih

grupa mikroorganizama. Također, EBPR zajednica bakterija nije jedinstvena u svakom mulju već se mijenja ovisno o vremenu i mjestu (Mino i sur., 1998).

Morfološke značajke PAO muljeva najprije su opisali Fuhs i Chen (1975) temeljene na mikroskopskim opažanjima PAO obogaćenog mulja, te su pokazali da su to nepokretni štapići ili koki koji obično formiraju klastere, te imaju pozitivno obojenje za PHB i sadrže Neisserove pozitivne granule u stanicama. U početku se vjerovalo da su to gram negativne bakterije, no kasnije je ustanovljeno da su gram pozitivne (Wagner i sur., 1994; Liu, 1995; Kawaharasaki i sur., 1999). Wagner i sur. (1994) pokazali su da u mulju dominiraju mikroorganizmi koji pripadaju  $\beta$ -podrazredu *Proteobacteria*, dok su prema Kawaharasaki i sur. (1999) dominantni organizmi pripadali  $\alpha$ -podrazredu *Proteobacteria*. Prema Mudaly i sur. (2000), koristeći tehnologiju fluorescencijske *in situ* hibridizacije (FISH), prevlast u muljevima se pojavljuje prema slijedećem redoslijedu:  $\beta$ -podrazredu *Proteobacteria* (22%),  $\alpha$ -podrazredu *Proteobacteria* (19%),  $\gamma$ -podrazredu *Proteobacteria* (17%) i *Actinobacter* (11%). Nakon nekoliko studija zaključeno je da *Actinobacter* nije sposoban provoditi istodobno asimilaciju VFA i otpuštanje fosfora pod anaerobnim uvjetima, što je bitno za PAO (Kang i sur., 2014, Tandoi i sur., 1998). Korištenjem FISH-a, dvije studije (Hesselmann i sur., 1999, Crocetti i sur., 2000) su pokazale da su većinu stanica u aktiviranom mulju predstavljali organizmi roda *Rhodocyclus* ( $\beta$ -podrazred *Proteobacteria*), a organizam za koji se vjeruje da je uglavnom odgovoran za EBPR je *Candidatus Accumulibacter phosphatis* zvan još i *Accumulibacter*. Kasnije je pokazano kroz studiju MAR-FISH (engl. microautoradiography - fluorescent *in situ* hybridization) da *Accumulibacter* imaju metabolizam koji je tipičan za PAO (Kong i sur., 2004). Mnoge su studije pokazale da *Accumulibacter* čini 4 - 22% svih bakterija u mulju, što je relativno visoki udio s obzirom na veliku raznolikost organizama mulja (Oehmen i sur., 2007). To dovodi do zaključka da je *Accumulibacter* važan organizam koji pridonosi uklanjanju fosfora u EBPR postrojenjima. Korištenjem MAR-FISH tehnike, Kong i sur. (2005) i Nguyen i sur. (2011) pokazali su da je druga grupa mikroorganizama zvanih *Tetrasphaera* prisutna u EBPR-u u većem broju, te je sposobna akumulirati polifosfate. U radu Kristiansen i sur., 2012, analizirali su metabolizam *Tetrasphaera* i pokazali da se razlikuje od metabolizma *Accumulibacter*. Time se potvrđuje da ne postoji organizam koji posjeduje tipičan metabolizam i morfologiju PAO-a.

### 2.3.3 Kompeticija PAO-GAO

EBPR je biološki postupak obrade otpadne vode, zbog čega se često javljaju problemi tijekom provedbe. Jedan od glavnih razloga neuspjeha je rast konkurentnih mikroorganizama. Primjer takvih organizama su denitrificirajući mikroorganizmi koji konkuriraju za kisik i izvor ugljika posebno u procesima simultanog uklanjanja dušika i fosfora, dok kod EBPR su rjeđa pojava (Kim i sur., 2008).

Najveću prijetnju EBPR-u čini nepoželjni rast glikogen akumulirajućih organizama (GAO), koji se mogu natjecati za izvore ugljika s PAO-ima. GAO-i imaju metabolizam prividno sličan metabolizmu PAO, ali kao izvor energije koriste unutarstanično pohranjene zalihe glikogena i reducirajuće ekvivalente koji omogućavaju anaerobno pohranjivanje VFA kao PHA bez ikakvog doprinosa polifosfata (van Loosdrecht i sur., 2016). GAO-i rastu pri uvjetima sličnima kao PAO-i, ali postoje neke razlike koje omogućavaju optimiranje procesa za prevlast PAO-a.

## 2.4 Utjecaj parametara na učinkovitost EBPR procesa

### 2.4.1 Izvor ugljika

Od samog početka istraživanja utjecaja izvora ugljika kod EBPR, najveća se pozornost daje izvorima ugljika koji pripadaju skupini kratkolančanih, nisko molekularnih monokarboksilnih kiselina (C1-C6) koji se nazivaju i kratkolančanim masnim kiselinama (*engl. short chain fatty acid*, SCFA) ili hlapivim masnim kiselinama (VFA). Značajno oslobađanje fosfora opaženo je kada se kao izvor ugljika upotrebljavaju acetat ili propionat (Fuhs i Chen, 1975; Arvin i Kristensen, 1985; Comeau i sur., 1987).

Kako bi se postiglo učinkovito uklanjanje fosfata, potrebno je prilagoditi izvor ugljika rastu PAO u odnosu na GAO. Provedena su razna istraživanja koja pokazuju da PAO mogu učinkovito koristiti mješavinu acetata i propionata, dok poznati GAO-i (*Competibacter*) preferiraju jedan izvor ugljika, kao što je acetat ili propionat (Carvalheira i sur., 2014a; Lopez-Vazquez i sur., 2009; Oehmen i sur., 2005a). Međutim, Dai i sur. (2007) su u svom istraživanju pokazali da druga grupa GAO-a (*Defluviicoccus vanus*) također učinkovito koriste mješavinu propionata i acetata te time konkuriraju PAO-ima. Ono što daje prednost PAO-ima nad GAO-ima, tvrde Oehmen i sur. (2005a), je njihova brza prilagodljivost promjenama izvora supstrata. Carvalheira i sur. (2014a) smatraju da kod PAO-a postoji anaerobna supstratna konkurencija za zajednički transportni mehanizam za acetat i propionat zbog koje se propionat brže troši kada

su prisutna oba izvora. Isto tako su primijetili da brzina otpuštanja fosfata u anaerobnim uvjetima opada povećanjem udjela propionata u mješavini oba izvora, dok u aerobnim uvjetima brzina trošenja ostaje neovisna o udjelima izvora ugljika. Vrlo je teško omogućiti potpuni rast jedne skupine mikroorganizama nad drugom jer su pri standardnim uvjetima (20° C, pH=7,0) apsorpcija supstrata i stopa rasta biomase PAO i GAO vrlo slične, osim ako se ne utječe vanjskim čimbenicima (npr. omjer P : VFA). Upravo je to razlog zašto se u laboratorijskim ispitivanjima EBPR koristi jedan izvor supstrata i inokulum obogaćen PAO-ima, a vanjski uvjeti se postavljaju tako da u što većoj mjeri onemoguće rast GAO-ima (Lopez-Vazquez i sur., 2009). Jedan od načina kontrole rasta je omjer KPK i P. Dominacija PAO-a postiže se u omjerima KPK : P od 10 do 20 mgKPK(mgP)<sup>-1</sup>, a GAO-a u omjerima iznad 50 mgKPK(mgP)<sup>-1</sup> (Oehmen i sur., 2007).

#### 2.4.2 pH-vrijednost

Smolders i sur. (1994) opazili su vezu između količine oslobođenog ortofosfata i utrošenog acetata u anaerobnim uvjetima u ovisnosti o pH. Budući da PAO cijepa polifosfat i time oslobađa fosfate kako bi se dobila energija za unos acetata i formiranje PHA, u početku se mislilo da bi omjer trebao biti konstantan. Međutim, prijenos acetata preko stanične membrane troši energiju i potrebna količina energije je pH ovisna, tj. povećanjem vanjskog pH dolazi do povećanja razlike potencijala na staničnoj membrani pa je potrebno više energije za prijenos acetata što se dobiva razgradnjom polifosfata. Eksperimentalno su pokazali da omjer oslobađanja fosfora i utroška acetata varira između 0,25 i 0,75 mol P (mol C)<sup>-1</sup> u rasponu pH od 5,5 do 8,5 (Smolders i sur., 1994). Filipe i sur. (2001a) su u svom radu dokazali da je potrošnja glikogena i akumulacija PHA neovisna od pH-vrijednosti u rasponu od 6,5 do 8,0 što znači da visoka potreba energije za unos acetata ne smanjuje sposobnost korištenja VFA.

pH ima snažan utjecaj na kompeticiju između PAO i GAO. Povećanje pH-vrijednosti pozitivno utječe na učinkovitost uklanjanja P dajući prednost PAO-a nad GAO-ima. Pretpostavlja se da je u anaerobnoj fazi pH od 7,25 kritična točka, ispod koje GAO brže troše VFA od PAO (Filipe i sur., 2001b). Nekoliko je studija doista pokazalo veće uklanjanje P kada je povećana anaerobna i/ili aerobna pH-vrijednost (od pH 7 do 7,5-8,5) (Schuler i Jenkins, 2002; Serafim i sur., 2002). Razlog tome je prevladavanje PAO nad GAO u mikrobnj zajednici. To su potvrdili Zhang i sur. (2005) kada su uočili gubitak PAO u mikrobnj zajednici smanjenjem pH sa 7,0 na 6,5. U nekim je istraživanjima zabilježeno smanjenje unosa VFA, otpuštanje P i unosa P pri pH-vrijednosti iznad 8,0 (Schuler i Jenkins, 2002; Oehmen i sur., 2005b).

### 2.4.3 Temperatura

Mnogi su autori u svojim radovima izvijestili da smanjenje temperature može povećati učinak EBPR sustava (Oehmen i sur., 2007). U različitim laboratorijskim studijama, pokazalo se da je PAO dominirajući mikroorganizam na nižim temperaturama, a to je povezano zajedno s poboljšanim učinkom EBPR sustava (Erdal et al., 2003, Lopez-Vazquez i sur., 2009, Panswad i sur. 2003). U studijama koje su proveli Panswad i sur. (2003), pokazalo se da su PAO-i mezofili nižeg raspona ili možda psihrofili i prevladavaju na temperaturi od 20 °C ili možda niže, dok su se GAO-i pokazali kao mezofilni organizmi srednjeg raspona s optimalnom temperaturom između 25,0 i 32,5 °C. Pokazali su i da je brzina otpuštanja P porasla s porastom temperature od 20 do 35 °C, dok je stopa uzimanja P smanjena. Važno je napomenuti da su Lopez-Vazquez i sur. (2009) utvrdili da su PAO dominantni mikroorganizam na 10 °C bez obzira na izvor ugljika ili pH, dok je rast GAO bio inhibiran što daje naznaku da je temperatura jedan od najvažnijih faktora za konkurenciju između PAO i GAO.

### 2.4.4 Ostali parametri

U pretjerano aeriranom procesu dolazi do iscrpljivanja PHA zbog čega u konačnici dolazi do smanjenog trošenja fosfora. Ako se u sustav uvodi organski supstrat, javlja se odmah oslobađanje fosfora. Međutim, oslobođeni fosfor ne može se potpuno ponovno uzeti jer prethodno smanjen sadržaj PHA ograničava brzinu uzimanja fosfora (Brđanović i sur., 1998). Calvarheira i sur. (2014b) su u svom istraživanju zaključili da koncentracija otopljenog kisika (*engl. dissolved oxygen*, DO) utječe na kompeticiju između PAO i GAO. Pokazalo se da PAO ima prednost nad GAO pri niskim razinama DO, budući da PAO imaju veći afinitet prema kisiku i time mogu održavati svoje djelovanje pri niskim razinama DO. Osim toga, koncentracija DO utječe i na nitrifikaciju. Ginige i sur. (2013) primijetili su da je smanjenje koncentracije DO s 2 na 0,8 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> povećalo učinkovitost uklanjanja fosfora te smanjilo stopu nitrifikacije zbog ograničenja kisika.

Starost mulja (*engl. sludge retention time*, SRT) ima značajan utjecaj na učinkovitost EBPR jer se fosfor u otpadnim vodama uklanja odvodnjom viška mulja u kojem je akumuliran fosfor. Nekoliko istraživanja je ispitivalo učinak SRT na kompeticiju između PAO i GAO. Seviour i sur. (2003) smatraju da GAO-i uspješno konkuriraju PAO-ima na velikom SRT, što rezultira smanjenjem uklanjanja fosfora u EBPR sustavu. Rodrigo i sur. (1999) također su zaključili da su kraći SRT korisni za PAO nakon što su uočili da je aktivnost biomase EBPR smanjena dok se SRT produžava, što sugerira da GAO može dominirati na velikom SRT. U

laboratorijskom reaktoru opskrbljenim acetatom, koji je radio na 30 °C i pH 7,5, Whang i Park (2006) promatrali su promjenu u dominantnoj mikrobnj populaciji od obogaćenog GAO do obogaćene PAO kulture pri snižavanju primijenjenog SRT od 10 do 3 dana. Whang i sur. (2007), su analizirali rad Whang i Park (2006) te zaključili da GAO imaju nešto nižu stopu rasta neto biomase od PAO, stoga PAO prevladavaju pri nižim SRT vrijednostima.

Otkrićem procesa EBPR (Barnard, 1976), vrlo brzo je postalo jasno da anaerobna faza mora biti apsolutno anaerobna. Prisutnost nitrata u ovoj fazi suzbija otpuštanje anaerobnog fosfora i smanjuje učinkovitosti obrade otpadne vode (Mc Laren i Wood, 1976). Za sustav koji postiže 88% uklanjanja fosfora, Malnou i sur. (1984) su uočili smanjenje učinkovitosti EBPR na 70% kada je nitrat dodan anaerobnom reaktoru. Smatra se da je nepovoljni utjecaj nitrata u anaerobnoj fazi uzrokovan kompeticijom između denitrifera i PAO za izvor ugljika (Barker i Dold, 1996), stoga veće količine KPK trebaju biti prisutne u anaerobnoj fazi kada je nitrat prisutan u influentu. Istraživanja su pokazala da istodobna prisutnost nitrata i organske tvari ne smanjuje neto uklanjanje fosfora, već se smanjuje omjer oslobođenog P i utrošenog C. Slično tome, simulacijske studije su pokazale da je dostupnost VFA u anaerobnoj fazi bitna za održavanje funkcije EBPR. Kada postoji visok sadržaj VFA, PAO mogu nadvladati obične heterotrofne organizme (*engl. ordinary heterotrophic organisms*, OHO) (Zheng i sur., 2014).

Koncentracija kationa ima važnu ulogu u održavanju stabilnosti EBPR procesa i vezanju fosfora u aktivnom mulju (Schönborn i sur., 2001). Budući da svaka molekula fosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) sadrži tri negativna naboja, ona ne može proći sama kroz staničnu membranu. Da prođe kroz staničnu membranu, molekula fosfata mora se povezati s pozitivno nabijenim ionima kao što su magnezij ( $\text{Mg}^{+2}$ ) i kalij ( $\text{K}^+$ ) kako bi postala neutralna. Eksperimenti su pokazali da su magnezij i kalij bitni kationi za EBPR, a ne samo pružanje neutralizacije naboja, dok kalcij i drugi kationi nisu od većeg značaja (Pattarkine i Randall, 1999). Nakon što se magnezij ili kalij iscrpe iz otpadne vode, u anaerobnoj zoni neće doći do oslobađanja fosfora. Međutim, u komunalnoj otpadnoj vodi obično se nalazi višak kationa te ionsko ograničenje uglavnom ne postoji (Randall i sur. 1992).

## **2.5 Istraživačka pitanja i radne hipoteze**

Prema dosadašnjoj literaturi može se ustanoviti kako nije bilo mnogo radova koji istraživaju utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata na učinkovitost EBPR procesa. Jedan od važnijih radova po tom pitanju je rad Randalla i Chapina (1997) kao i rad Filipović (2018),

koji dokazuju inhibiciju biološkog uklanjanja fosfora pri visokim koncentracijama acetata. Ti radovi pridonijeli su radnoj hipotezi da postoji inhibitorno djelovanje acetata na metabolizam PAO-a, odnosno na učinkovitost EBPR-a. Zbog toga je u ovom radu provedeno istraživanje kako bi se odgovorilo na slijedeća pitanja:

1. Može li se aktivni mulj postupnim povećanjem koncentracije natrijeva acetata prilagoditi na visoke koncentracije istog?
2. Postoji li negativan utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata na učinkovitost uklanjanja fosfora ukoliko se proces provodi u kratkim ciklusima od 6 h?



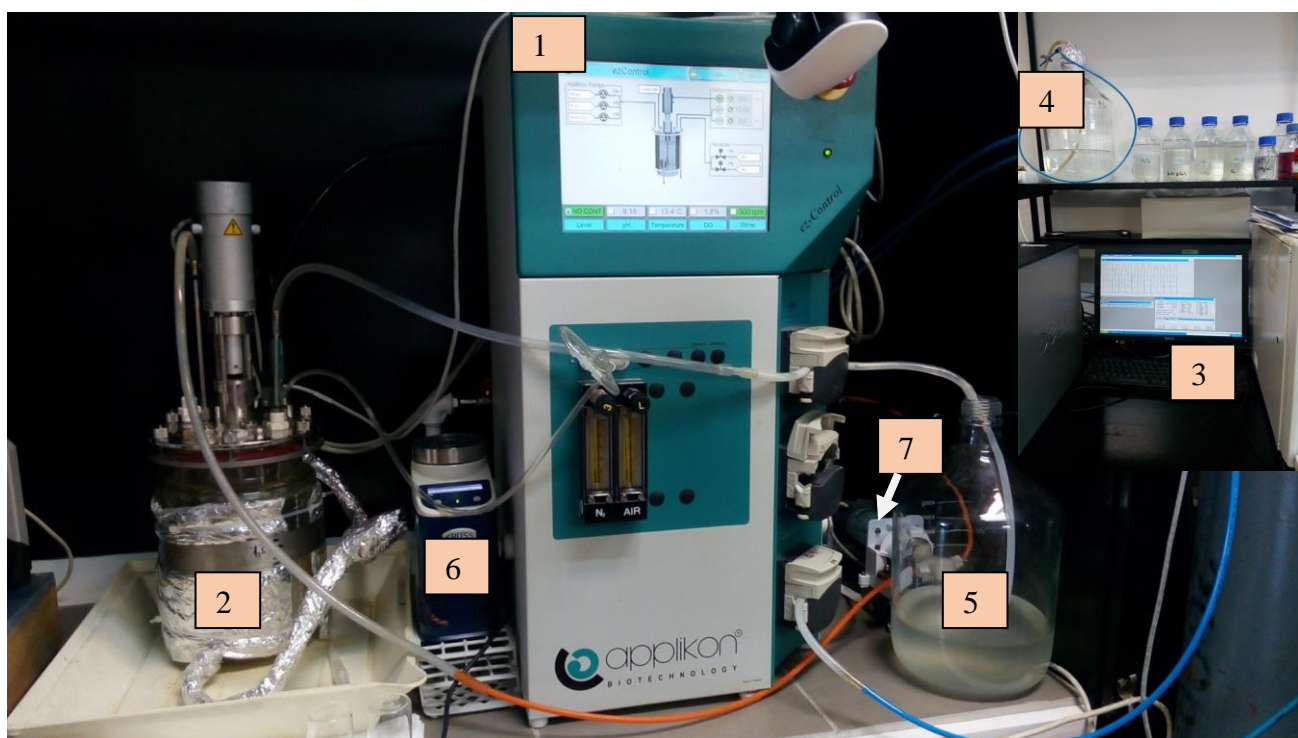
## 3 EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 Obrada sintetičke otpadne vode u laboratorijskom SBR uređaju

U laboratorijskom SBR uređaju tvrtke Applikon (slika 4) provedena je biološka obrada sintetičke otpadne vode s različitim KPK vrijednostima (tablica 4). Za obradu sintetičke otpadne vode korišten je aktivni mulj koji je bio uzet iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Velike Gorice.

Prije početka eksperimenta mulj je ostavljen da se istaloži unutar bioreaktora, zatim su vodeni ostatak i nečistoće dekantirani, a u bioreaktor s muljem je dodano 1750 mL influenta bez natrijeva acetata. Sustav je potom priključen na Applikon i influent s natrijevim acetatom. Obrada otpadne vode je provedena u SBR uređaju korisnog volumena 2 L koji je radio u 4 ciklusa u trajanju od 6 h tijekom 79 dana. U svakom ciklusu, iz posude u kojoj je pripremljena sintetička otpadna voda (influent), peristaltičkom pumpom je dodano 250 mL influenta, stoga je dnevni protok iznosio 1 L dan<sup>-1</sup>. Faze rada ciklusa obrade prikazane su u tablici 2. Punjenje reaktora influentom trajalo je 120 minuta uz miješanje miješalicom pri 100 omin<sup>-1</sup>. Nakon punjenja slijedio je anaerobni rad uz miješanje od 100 omin<sup>-1</sup>, a zatim aerobni rad s ciljem uklanjanja fosfata. Volumen viška mulja je odvođen jednom dnevno na kraju aerobne faze sukladno održavanju željenih SRT vrijednosti izračunatih iz jednadžbe ukupne mase mulja prema Ekama i Wentzel, 2008 i prikazanih u tablici 3. Ciklus je završio fazama taloženja (20 min) i uzimanja efluenta (10 min). Nakon završetka ciklusa, obrađena voda (efluent) odvođena je pomoću crpke u predviđenu posudu iz koje je uziman uzorak efluenta za analizu. Pokus je trajao 79 dana tijekom kojih su obrađivani influenti različitih sastava i KPK vrijednosti. Tijek provedbe pokusa prikazan je u tablici 3.

Proces obrade sintetičke otpadne vode praćen je pomoću ugrađenih elektroda za mjerenje pH i koncentracije otopljenog kisika te pomoću senzora za mjerenje temperature. Elektrode i senzor su preko kontrolno-upravljačke jedinice spojeni na računalo. Računalo je uz pomoć odgovarajućeg programa primalo povratne informacije o stanju u reaktoru te vršilo kontrolu nad parametrima procesa (brzina miješanja i aeracija). Miješanje se provodilo upotrebom dvostrukog lopatastog miješala. Kako bi se analizirala biološka aktivnost PAO, provedena su testiranja biološke aktivnosti PAO-a, pri čemu je određivana koncentracija otpuštenog i utrošenog fosfata (neto vezanje fosfora), te koncentracija asimiliranog KPK. Testiranja biološke aktivnosti PAO-a provedena su 8., 14., 21., 29., 35., 43., 57., 68. i 76. dan.



**Slika 4.** SBR: 1.) kontrolno–upravljačka jedinica, 2.) reaktor, 3.) računalo za vođenje procesa, 4.) spremnik influenta 5.) spremnik efluenta, 6.) protočni termostad 7.) pumpa za izuzimanje viška mulja (vlastita fotografija)

SBR uređaj (Slika 4) sastojao se od nekoliko komponenata:

1. Kontrolno-upravljačka jedinica za praćenje uvjeta pokusa kao što su: pH, temperatura, brzina miješanja i aeracija.
2. Reaktor za odvijanje procesa obrade sintetičke otpadne vode. Uređaj je bio opremljen dvostruko lopatastim miješalom i elektrodama za praćenje pH, temperature i koncentracije kisika koje mjere stanja i šalju informacije u kontrolno-upravljačku jedinicu.
3. Računalo s instaliranim računalnim programom za kontrolu i vođenje procesa pomoću kojeg su pohranjivane povratne informacije o stanju u reaktoru, te analizirani podaci dobiveni na temelju tih informacija.
4. Spremnik influenta iz kojeg je pomoću peristaltičke crpke dobavljan influent u reaktor.
5. Spremnik u kojeg je odvođen efluent iz reaktora.

6. Protočni termostatski za recirkuliranje rashladne vode u plaštu reaktora.
7. Pumpa za vađenje viška mulja iz reaktora.

**Tablica 2.** Trajanje faza u ciklusu obrade sintetičke otpadne vode

FAZA	AKTIVNOST	TRAJANJE (min)
ANAEROBNA	PRITOK INFLUENTA	120
	ANAEROBAN RAD	45
AEROBNA	AEROBAN RAD	160
	TALOŽENJE	20
	IZUZIMANJE EFLUENTA	10

**Tablica 3.** Uvjeti pokusa i izmjereni prosječni sastav sintetičke otpadne vode kroz 79 dana pokusa

DAN	KPK (mgL <sup>-1</sup> )	PO <sub>4</sub> -P (mgL <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> -N (mgL <sup>-1</sup> )	SRT (dan)	Volumen viška mulja (mgL <sup>-1</sup> dan <sup>-1</sup> )
0 - 13	619	36	53	47	43
14 - 20	924	50	94	22	91
21 - 28	1336	85	128	14	143
29 - 35	987	54	84	22	91
36 - 42	616	34	51	47	43
43 - 57	980	45	86	22	91
58 - 70	1383	71	112	14	143
71 - 79	1815	84	151	10	200

*Jednadžba ukupne mase mulja u bioreaktoru (Ekama i Wentzel, 2008) :*

$$m_{Xt} = \frac{Q_i * S_{bi} * Y * SRT}{1 + b * SRT} + f_d * b * SRT * \frac{Q_i * S_{bi} * Y * SRT}{1 + b * SRT} + f_i * \frac{Q_i * S_{bi} * Y * SRT}{1 + b * SRT}$$

$m_{Xt}$  – ukupna masa mulja u bioreaktoru (g)

$Q_i$  – protok otpadne vode [Ldan<sup>-1</sup>]

$S_{bi}$  – biorazgradiva organska tvar u ulaznoj vodi [gKPKL<sup>-1</sup>]

$Y$  – stupanj konverzije u biomasu [gVSS(gKPK)<sup>-1</sup>]

$SRT$  – starost mulja (dan)

b – specifična brzina odumiranja stanica,  $0,04 \text{ gEVSS(gVSS dan)}^{-1}$  (*engl. effluent volatile suspended solids, EVSS*)

fd - udio nerazgradivih ostataka stanica nakon lize u živim stanicama,  $0,25 \text{ gEVSS(gAVSS)}^{-1}$  (*engl. active volatile suspended solids, AVSS*)

fi - faktor za udio ISS u VSS (0,15)

### 3.2 Karakteristike i sastav sintetičke otpadne vode

Sastav sintetičke otpadne vode pripremljen je prema uzoru na Smolders i sur. (1994) i prikazan je u tablici 4. Influent je pripreman prema potrebi u staklenoj posudi od 10 L na način da je, ovisno o KPK vrijednosti, izvagana određena količina bezvodnog natrijeva acetata (Fisher Bioreagents, Fisher Scientific International Inc., New Jersey, SAD), te otopljen u malo destilirane vode i dodan u navedenu posudu koja je bila do otprilike pola volumena napunjena destiliranom vodom. Prethodno je pripremljeno šest koncentriranih stoka otopina od 1 L kao izvora makro- i mikro-nutrijenata (tablica 5). Određeni volumen pojedine otopine dodavan je u bocu za pripremu influenta. Posuda je zatim nadopunjena destiliranom vodom do 9 L, zatvorena vatenim čepom te autoklavirana. Otopina  $\text{NaHCO}_3$  je nakon 20. dana prestala biti dodavana u influent.

Za sprječavanje rasta nitrificirajućih bakterija dnevno je u bioreaktor dodavano 2 mL alil-N tiouree (98 % ATU; Acros organics, Fisher Scientific International, Inc., Pittsburgh, SAD).

**Tablica 4.** Ciljane koncentracije spojeva u sintetičkoj otpadnoj vodi

KPK [ $\text{mgL}^{-1}$ ]	600	1000	1400	1800
	$\gamma[\text{mgL}^{-1}]$			
$\text{NaHCO}_3$	30,0	50,0	70,0	90,0
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	80,0	133,3	186,7	240,0
$\text{CaCl}_2$	20,0	33,3	46,7	60,0
$\text{NH}_4\text{Cl}$	168,0	280,0	392,0	504,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	131,8	219,7	307,6	395,4
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,600			
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,048			
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,024			
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,012			
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,048			
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,060			
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,060			
KI	0,072			

**Tablica 5.** Sastav koncentriranih mineralnih stok otopina

OTOPINA 1	$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska) $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck – Alkaloid, Skopje, Makedonija) $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska) $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska) $\text{H}_3\text{BO}_3$ p.a. (Gram – mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) KI (Gram – mol d.o.o., Zagre, Hrvatska)
OTOPINA 2	$\text{NaHCO}_3$ p.a. (Lach – Ner, Tovarni 157·277 11 Neratovice, Češka)
OTOPINA 3	$\text{NH}_4\text{Cl}$ p.a. (Gram – mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
OTOPINA 4	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
OTOPINA 5	$\text{CaCl}_2$ p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
OTOPINA 6	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

### 3.3 Održavanje i mjerenje temperature

Temperatura u bioreaktoru određivana je pomoću termometra. Termometar je bio povezan s kontrolno-upravljačkom jedinicom SBR-a, preko čega je temperatura mjerena svakih 30 minuta. Regulacija temperature u reaktoru provedena je preko plašta unutar kojeg je protočnim termostatom (Krüss, Njemačka) cirkulirala rashladna voda.

*Pribor :* Protočni termostat PT31 (Krüss)

Termometar

### 3.4 Mjerenje pH-vrijednosti

Staklenom elektrodom (AppliSens pH+ elektroda, Applikon) određivana je pH-vrijednost sintetičke otpadne vode u reaktoru. Elektroda je bila konstantno uronjena u reaktor te povezana s kontrolno-upravljačkom jedinicom SBR-a. pH-vrijednost je konstantno mjerena i praćena. Elektroda je prije uporabe kalibrirana uranjanjem u pufer otopinu pH-vrijednosti 7.

*Pribor :* AppliSens pH+ elektroda, Applikon

*Kemikalije :* Pufer otopina CertiPUR, Buffer solution pH 7, Merck

### 3.5 Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Koncentracija otopljenog kisika u reaktoru određivana je pomoću kisikove elektrode (AppliSens DO elektroda, Applikon) povezane s kontrolno-upravljačkom jedinicom SBR-a. Koncentracija otopljenog kisika je bila konstantno mjerena. Elektroda je prije uporabe kalibrirana uranjanjem u otopinu zasićenu kisikom.

*Pribor:* AppliSens DO elektroda, Applikon

### 3.6 Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS), ukupne organske suspendirane tvari (VSS) i ukupne anorganske tvari (ISS)

Za određivanje TSS (*engl. total suspended solids*) i VSS (*engl. volatile suspended solids*) korišten je stakleni filter papir (1 $\mu$ m, GF/C, Whatman). Prije određivanja ukupne suspendirane tvari bilo je potrebno pripremiti filter papir na način da je preko papirića profiltrirano 10 mL destilirane vode koji je nakon toga stavljen na sušenje u sušionik na 105 °C do konstantne mase. Zatim je, prije same filtracije uzorka, na analitičkoj vagi (Mettler, Type H 15), izvagana masa čistog filter papira. Određeni volumen uzorka (25 mL ili 30 mL) je profiltriran preko pripremljenog filter papira uz pomoć vakuum sisaljke, te je nakon toga papir s uzorkom premješten u metalnu posudu i sušen u sušioniku na 105 °C do konstante mase. Nakon sušenja, filter s talogom je izvagan te je oduzimanjem mase samog papirića dobivena TSS vrijednost. Isti filter papir s talogom je potom stavljen u porculansku zdjelicu, spaljen na plameniku, žaren u mufolnoj peći (500 °C, 3 h), ohlađen u eksikatoru te izvagan. Oduzimanjem mase čistog papirića od mase papirića s talogom nakon žarenja dobivena je ISS (*engl. inorganic suspended solids*) vrijednost. Ukupna organska suspendirana tvar (VSS) određena je iz razlike TSS i ISS.

*Pribor:* Filter papirić (1 $\mu$ m, GF/C, Whatman)

Analitička vaga, Mettler, Type H 15

Metalna posuda

Vakuum sisaljka

Sušionik, Instrumentaria, ST-01/02

Porculanska zdjelica

Plamenik

Eksikator

Mufolna peć, Heraew

### 3.7 Određivanje indeksa mulja (SVI)

Za određivanje indeksa mulja korištena je menzura u koju se napunio uzorak mulja do određenog volumena ( $V_{uz}$ ). Uzorak je ostavljen 30 minuta da se istaloži. Nakon 30 minuta taloženja očitana je volumen koji zauzima istaloženi mulj ( $V_m$ ). SVI je izračunat prema slijedećoj jednadžbi:

$$SVI = \frac{V_m * 1000}{V_{uz} * TSS} [mLg^{-1}]$$

*Pribor:* Menzura

Zaporni sat

### 3.8 Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

Određivanje kemijske potrošnje kisika provedeno je pomoću kivetnih testova LCK 514 i LCK 314 (Hach Lange). Prema uputi proizvođača u kivetu je pipetom (Eppendorf) dodano 2 mL filtriranog ili nefiltriranog uzorka odgovarajućeg razrjeđenja iz reaktora, te je dobro pomiješano. Kiveta je zatim stavljena u digestor (Hach Lange) na 15 minuta pri temperaturi od 175 °C kako bi se provela digestija. Nakon završene digestije, kiveta je promiješana i ostavljena da se ohladi na sobnu temperaturu. Spektrofotometrom HACH Lange DR3900 je određena KPK vrijednost.

*Pribor:* Kivetni testovi LCK 514 (100 – 2000 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>) i LCK 314 (15 – 150 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>) za mjerenje KPK (Hach Lange)

Varijabilna ručna pipeta (Eppendorf) s nastavcima

Digestor (HT 200S, Hach Lange)

Spektrofotometar (HACH Lange DR3900)

Filter za špricu Chromafil Xtra GF-100/25, 1,0μm (MACHEREY-NAGEL GmbH Co KG, Njemačka)

### 3.9 Određivanje ukupnog fosfora (TP)

Koncentracija fosfatnih iona u uzorku određivana je kivetnim testom LCK 350 (Hach Lange). Prema uputi proizvođača u kivetu je pipetom dodano 0,4 mL uzorka odgovarajućeg razrjeđenja. Kiveta je zatim zatvorena s DosiCap Zip čepom, dobro pomiješana te stavljena u digestor na 15 minuta pri temperaturi od 175 °C. Nakon provedene digestije, kiveta je ostavljena da se ohladi na sobnu temperaturu. Zatim je, prema uputi proizvođača, dodano 0,5 mL reagensa B i zatvoreno DosiCap čepom, te dobro protreseno i ostavljeno odstajati 10 minuta. Spektrofotometrom HACH Lange DR3900 je određena koncentracija ukupnog fosfora.

*Pribor:* Kivetni test LCK 350 (2,0 - 20,0 mgPL<sup>-1</sup>) za mjerenje koncentracije ukupnog fosfora i otopljenog fosfora (Hach Lange)

Varijabilna ručna pipeta (Eppendorf) s nastavcima

Digestor (HT 200S, Hach Lange)

Spektrofotometar HACH Lange DR3900

### 3.10 Određivanje koncentracije otopljenog fosfora

Koncentracija otopljenog fosfora određivana je pomoću Sepctroquant phosphates (Merck, Njemačka) testa. U kivetu je pipetom (Eppendorf) dodano 5 mL filtriranog ili nefiltriranog uzorka odgovarajućeg razrjeđenja te je dodano 5 kapi PO<sub>4</sub>-1 reagensa i jedna žličica PO<sub>4</sub>-2 reagensa. Zatim je kiveta zatvorena, promiješana i ostavljena da odstoji. Nakon 5 minuta uzorak iz kivete je prenijet u spektrofotometrijsku kivetu koja je potom stavljena u spektrofotometar pomoću kojeg je određena koncentracija otopljenog fosfora.

*Pribor:* Sepctroquant phosphates (0,1 – 5,0 mg PO<sub>4</sub>-P/L; Merck)

Varijabilna ručna pipeta s nastavcima (Eppendorf)

Kiveta

Spektrofotometrijska kiveta

Spektrofotometar (DR3900; Hach Lange)

Filter za špricu Chromafil Xtra GF-100/25, 1,0µm (MACHEREY-NAGEL GmbH Co KG, Njemačka)



### 3.11 Određivanje koncentracije ukupnog dušika (TN)

Koncentracija ukupnog dušika je određivana pomoću kivetnog testa LCK 238 LATON (Hach Lange). U reakcijsku kivetu, prema uputi proizvođača, pipetom je dodano 0,5 mL uzorka odgovarajućeg razrjeđenja, 2 mL reagensa A i jedna tableta B. Kiveta je zatim stavljena u digestor (Hach Lange) na 15 minuta pri temperaturi od 175 °C. Nakon provedene digestije reakcijska kiveta je ostavljena da se ohladi na sobnu temperaturu. Zatim je dodan MicroCap C, te je uzeto 0,5 mL digestiranog uzorka u kivetu koja sadrži 60 % sumporne kiseline i 33 % fosfatne kiseline, zajedno s reagensom D. Uzorak je ostavljen mirovati 15 min nakon čega je na spektrofotometru određena koncentracija ukupnog dušika.

*Pribor:* Kivetni test LCK 238 LATON (5-40 mgNL<sup>-1</sup>) za mjerenje koncentracije ukupnog dušika (Hach Lange)

Varijabilna ručna pipeta (Eppendorf) s nastavcima

Digestor (HT 200S, Hach Lange )

Spektrofotometar HACH Lange DR3900

### 3.12 Određivanje koncentracije nitrata

Koncentracija nitratnih iona u uzorku određivana je pomoću kivetnog testa LCK 339 (Hach Lange). 1 mL filtriranog uzorka odgovarajućeg razrjeđenja pipetom je preneseno u kivetu te je dodano 0,2 mL reagensa A. Nakon 15 min mirovanja, pomoću spektrofotometra je određena koncentracija nitratnih iona.

*Pribor:* Kivetni test LCK 339 (0,23 – 13,50 mgL<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub> – N) za mjerenje koncentracije nitrata (Hach Lange)

Varijabilna ručna pipeta (Eppendorf) s nastavcima

Spektrofotometar HACH Lange DR3900

Filter za špricu Chromafil Xtra GF-100/25, 1,0µm (MACHEREY-NAGEL GmbH Co KG, Njemačka)

### 3.13 Određivanje koncentracije amonijaka

Koncentracija amonijevih iona određivana je pomoću LCK 304 kivetnog testa (Hach Lange). Prema uputi proizvođača, u reakcijsku kivetu pipetom je dodano 0,2 mL filtriranog uzorka odgovarajućeg razrjeđenja, te je zatvorena s DosiCap Zip čepom. Reakcijska kiveta je

ostavljena 5 minuta, nakon čega je pomoću spektrofotometra određena koncentracija amonijaka.

*Pribor:* Kivetni test LCK 304 (0.015 – 2 mg NH<sub>4</sub>-N/L ; Hach Lange)  
Varijabilna ručna pipeta s nastavcima (Eppendorf)  
Spektrofotometar (DR3900; Hach Lange)  
Filter za špricu Chromafil Xtra GF-100/25, 1,0µm (MACHEREY-NAGEL GmbH Co KG, Njemačka)

### **3.14 Mikroskopiranje uzorka aktivnog mulja**

Za promatranje uzorka aktivnog mulja korištena je metoda bojanja po Neisseru. Bojanje po Neisseru je mikroskopska metoda za otkrivanje prisutnosti metakromatskih granula u stanicama bakterija (Babes-Ernst polarna tjelešca). Metilensko plavilo i kristal violet se pri definiranom pH vežu uz polarna tjelešca (volutinska tjelešca uključujući poli-P), ali ne i uz ostatak bakterijske stanice. Na taj način polarna tjelešca pod mikroskopom postaju vidljiva kao tamne točke. Pri visokom pH dolazi do vezanja boje uz negativno nabijene materijale u staničnim stjenkama ili granulama. Ova metoda je stoga korisna za bojanje bakterija koje akumuliraju fosfate (PAO). Neisser-pozitivne stanice se pod mikroskopom uočavaju kao plave/sive ili ljubičaste, a Neisser-negativne stanice kao žute/smečkaste (van Loosdrecht i sur., 2016).

*Pribor:* Mikroskop  
Otopina kristalvioleta  
Otopina metilenskog plavila  
Otopina kontrastnog bojila (Bismarckova smeđa)  
Radna otopina (svježa mješavina koja sadrži 2/3 otopine metilenskog plavila i 1/3 otopine kristalvioleta)

#### *Opis pripreme uzorka:*

Uzorak je u tankom sloju razmazan na predmetnicu i ostavljen na zraku da se osuši pri sobnoj temperaturi. Zatim je uzorak zaliven svježe pripremljenom radnom otopinom i ostavljen na zraku 15 s. Bojilo je nježno isprano vodovodnom vodom s obje strane. Preparat je potom zaliven otopinom kontrastnog bojila i ostavljen 1 min. Kontrastno bojilo je također nježno

isprano s obiju strana i predmetnica je na kraju ostavljena da se osuši na zraku. Uzorak je na kraju promatran bez pokrovnice pod mikroskopom s imerzijskim objektivom sa svijetlim vidnim poljem, izravnim osvjetljenjem.

### **3.15 Određivanje maksimalne brzine anaerobnog otpuštanja fosfora, maksimalne specifične brzine asimilacije KPK i NETO uklonjenog fosfora**

Kako bi se analizirala biološka aktivnost PAO provedena su testiranja pri kojima je u vrijeme dodavanja influenta (anaerobna faza), dodavan ukupni volumen influenta za taj ciklus (250 mL) u kojem je otopljen acetat u količini koja je potrebna za ostvarivanje željene KPK vrijednosti u reaktoru. Svakih 30 min uziman je uzorak mulja izravno iz SBR-a. U nefiltriranom uzorku određivana je TSS i VSS vrijednost. Uzorak iz reaktora je profiltriran te je u tako filtriranom uzorku određivana KPK vrijednost i vrijednost ortofosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Podaci su bilježeni grafički u MS Excel programu. Iz grafičkog prikaza ovisnosti koncentracije fosfora o vremenu te iz podataka na početku mjerenja otpuštanja fosfora kada je brzina bila najveća, određen je koeficijent smjera krivulje. Koeficijent smjera jednak je maksimalnoj brzini anaerobnog otpuštanja fosfora. Tako dobivena maksimalna brzina anaerobnog otpuštanja fosfora izražena u  $\text{mgP-PO}_4\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$  podijeljena je s koncentracijom VSS, te je dobivena specifična maksimalna brzina anaerobnog otpuštanja fosfora izražena u  $\text{mg P-PO}_4(\text{gVSS})^{-1}\text{h}^{-1}$ . Maksimalna specifična brzina asimilacije acetata izražena u  $\text{mgKPK}(\text{gVSS})^{-1}\text{h}^{-1}$  je dobivena na isti način kao i maksimalna specifična brzina anaerobnog otpuštanja fosfora.

Vrijednost NETO uklonjenog fosfora, izražena u  $\text{mgP-PO}_4(\text{gVSS})^{-1}$ , dobivena je iz razlike koncentracije fosfora na početku testiranja u trenutku kada je dodan influent s acetatom u reaktor i konačne koncentracije na kraju aerobne faze, podijeljene s koncentracijom VSS-a mulja.

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

Napredno biološko uklanjanje fosfora (EBPR) postiže se aktivnošću organizama koji akumuliraju fosfor (PAO), stoga učinkovitost EBPR-a ovisi o aktivnosti PAO-a. Brojni čimbenici imaju utjecaj na rast i aktivnost organizama koji akumuliraju fosfor, a glavna prijetnja njihovom rastu je rast konkurentnih organizama koji akumuliraju glikogen. Jedan od važnijih utjecajnih čimbenika je izvor ugljika. Mnoga su istraživanja potvrdila da su acetat i propionat, kao i njihova mješavina, najbolji izvori ugljika za rast PAO-a (Fuhs i Chen, 1975; Arvin i Kristensen, 1985; Comeau i sur., 1987; Carvalheira i sur., 2014a; Lopez-Vazquez i sur., 2009; Oehmen i sur., 2005a). Vrlo slične zahtjeve za izvorom ugljika imaju i GAO-i (Lopez-Vazquez i sur., 2009; Dai i sur., 2007). Osim vrste izvora ugljika, utjecaj na rast i aktivnost PAO-a ima i koncentracija izvora ugljika. Ono što omogućava prevlast PAO-a nad GAO-ima je odnos KPK i fosfora. Dominacija PAO-a postiže se u omjerima KPK i P od 10 do 20 mgKPK(mgP)<sup>-1</sup>, a GAO-a u omjerima iznad 50 mgKPK(mgP)<sup>-1</sup> (Oehmen i sur., 2007). U laboratorijskim ispitivanjima prevlast PAO-a nad GAO-ima najčešće se postiže ostalim vanjskim čimbenicima poput pH i temperature (pH >7,25 i temperatura < 20°C).

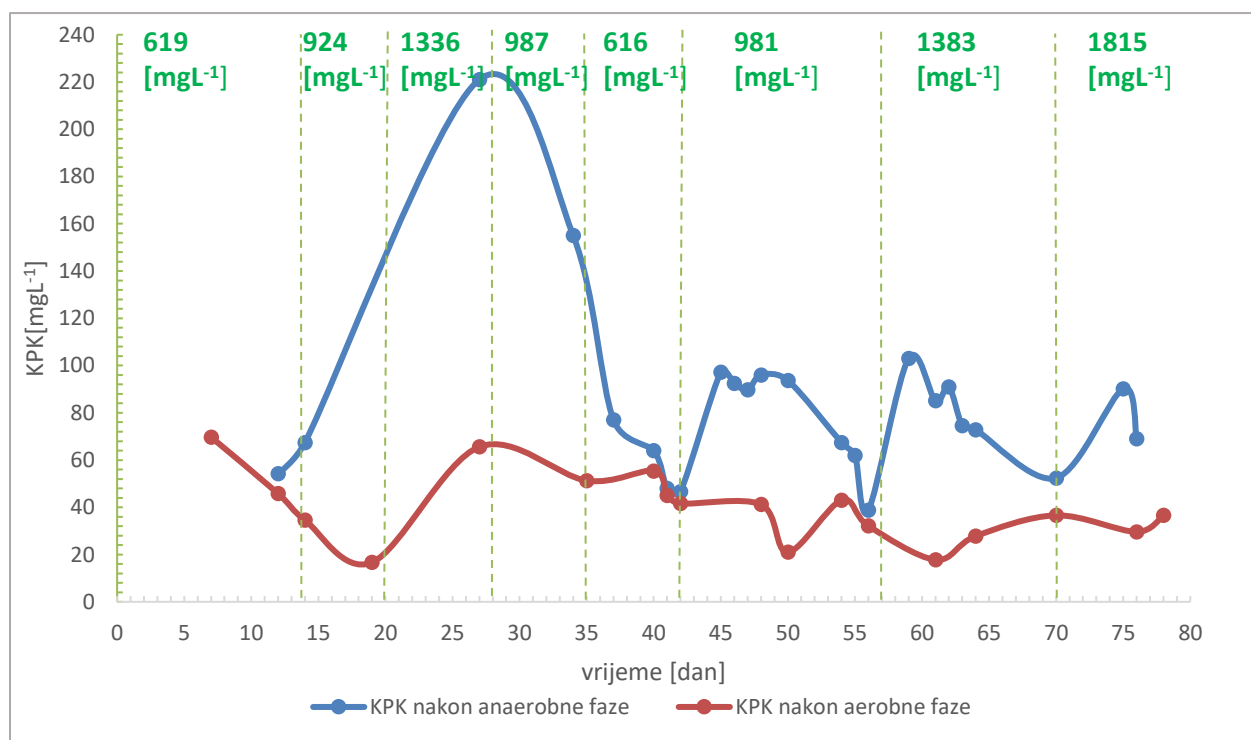
Ovaj rad se temeljio na ispitivanju rasta i aktivnosti PAO-a uzgajanih na različitim koncentracijama natrijeva acetata kao jedinog izvora ugljika. Ono što se postavilo kao cilj ispitivanja je uzgoj aktivnog mulja obogaćenog PAO-ima koji će biti učinkoviti pri visokim koncentracijama acetata u sintetičkoj otpadnoj vodi. Tijekom provedbe pokusa promatran je utjecaj promjene koncentracije natrijeva acetata na aktivnost i rast PAO-a. Pokus je proveden u laboratorijskom SBR uređaju u kojem su tijekom jednog dana izmjenjivane 4 faze po 6 sati. Svaka faza sastojala se od punjenja bioreaktora influentom, anaerobnog rada, aerobnog rada i odvodnje efluenta, a izdvajanje mulja provodilo se jednom dnevno. Izmjenom anaerobne i aerobne faze, podešavanjem temperature, mjerenjem pH, te dodatkom ATU (alil-N tiourea) stvoreno je okruženje za prevlast PAO-a nad drugim mikroorganizmima aktivnog mulja. Ono što se uzelo u obzir prije postavljanja cilja rada je mogućnost negativnog utjecaja visoke koncentracije natrijeva acetata na učinkovitost obrade. Randal i Chapin (1997) u svom radu su ispitivali negativan utjecaj acetata na učinkovitost BPR-a (*engl. biological phosphorus removal*, BPR) povećavajući komunalnoj otpadnoj vodi koncentraciju natrijeva acetata od 25 do 800 mgL<sup>-1</sup>. Pokus su proveli u sustavu s anaerobnom, anoksičnom i aerobnom jedinicom s povratom aktivnog mulja. SRT vrijednost iznosila je 5 dana. Dodatak acetata i fosfora vršio se neposredno prije dovođenja influenta u sustav, tako da je sav dodani acetat unesen u anaerobnu

zonu. Na početku pokusa s povećanjem dodatka acetata od 25 na 50 mgL<sup>-1</sup> dolazi do pada učinkovitosti BPR-a. Tek nakon dužeg održavanja procesa s influentom od 50 mgL<sup>-1</sup> acetata dolazi do ponovnog uspostavljanja uspješnog BPR-a. Nakon toga se postupno povećavala koncentracija natrijava acetata. Rezultati su pokazali da pri koncentraciji acetata od 800 mgL<sup>-1</sup> dolazi do narušavanja učinkovitosti procesa. Autori smatraju da je razlog prijenos visoke koncentracije acetata iz anaerobne u aerobnu koja potiče rast filamentoznih organizama uzrokujući time povećanje SVI. Visok SVI dovodi do „ispiranja“ mulja van iz sustava, a time i do narušavanja procesa. Isto tako je Filipović (2018) u svom radu provela dva pokusa u kojima su korištene različite koncentracije natrijeva acetata (3400 mgL<sup>-1</sup> i 1200 mgL<sup>-1</sup>). Pokusi su provedeni u SBR-u u ciklusima od 24 h, te se pokazalo da je pri većoj koncentraciji acetata aktivnost PAO-a neznatna, dok pri nižoj koncentraciji PAO-i pokazuju aktivnost. Aktivnost PAO-a, autorica pripisuje dužem vremenu prilagodbe mulja kao i većoj početnoj koncentraciji PAO-a u mulju. Prema tome, u ovom radu koncentracija influenta je postupno povećavana s pretpostavkom da će se aktivni mulj prilagoditi višim koncentracijama natrijeva acetata i da će uklanjati fosfor i pri koncentraciji acetata izraženoj kao KPK od 1800 mg/L što je bila ciljana najviša koncentracija.

S obzirom na mnoga istraživanja, spomenuta na početku rasprave, temperatura i pH-vrijednost bili su glavni čimbenici kontrole uzgoja PAO-a. Temperatura je stoga, mjerena i regulirana tijekom cijelog pokusa s ciljem održavanja na temperaturi nižoj od 20 °C kako bi se smanjila mogućnost rasta GAO-a. Zbog vanjskih uvjeta temperaturu je bilo nužno regulirati, a temperaturne vrijednosti su varirale od 9,3 °C do 24,1 °C sa srednjom vrijednosti od 13,2 °C i standardnom devijacijom 1,8 °C. Isto tako, kako bi se održavali optimalni uvjeti za rast PAO-a, mjerena je pH-vrijednost s ciljem da ne padne ispod kritične vrijednosti od 7,25. Tijekom pokusa nije regulirana pH-vrijednost, već je pH-vrijednost bila pod utjecajem samog procesa. Raspon pH-vrijednosti je bio od 7,3 do 8,8 sa srednjom vrijednosti od 8,1. Također, još jedan parametar važan je za dominaciju PAO-a nad GAO-ima, a to je omjer KPK i fosfora. Kao što je spomenuto na početku rasprave, PAO-i preferiraju niže omjere KPK i fosfata, stoga je tijekom postupnog povećanja koncentracije natrijeva acetata u influentu povećavana i koncentracija ulaznog fosfora. Omjeri su bili unutar raspona od 15,72 do 21,66 mgKPK(mgP)<sup>-1</sup> što je u skladu s vrijednostima prema Oehmen i sur. (2007).

Prema teoriji EBPR-a, PAO-i tijekom anaerobne faze koriste biološki lako razgradive organske tvari (u ovom slučaju natrijev acetat) pri čemu ih nakupljaju unutar stanica u obliku

PHA pomoću razgradnje druga dva unutarstanična polimera poli-P i glikogena. U anaerobnom dijelu PAO-ima više nije potreban izvor energije jer su ga tijekom anaerobne faze skladištili u obliku PHA, pa ga sada u aerobnim mogu iskoristiti. Prema tome, u anaerobnoj fazi potrošnja natrijeva acetata bi trebala biti značajna ukoliko u aktivnom mulju prevladavaju PAO-i, a potrošnje natrijeva acetata u aerobnoj fazi ne bi trebalo biti ili bi trebala biti manja nego u anaerobnoj fazi ukoliko se u aktivnom mulju nalaze i drugi mikroorganizmi (npr. OHO) jer bi PAO trebali potrošiti većinu acetata u anaerobnoj fazi. Koncentracija natrijeva acetata u ovom pokusu, izražena je kao KPK vrijednost. Kemijska potrošnja kisika predstavlja količinu kalijeva bikromata koja je potrebna za oksidaciju organske tvari u vodi. Međutim, u praksi se KPK ne izražava kao utrošak kalijevog bikromata, nego kao teoretski utrošak kisika ( $O_2$ ) za oksidaciju ( $mgO_2L^{-1}$ ) jer u obradi otpadne vode bakterije za oksidaciju troše kisik pa je lakše izražavati KPK kao utrošak kisika (Matošić, 2015). Na slici 5. prikazane su KPK vrijednosti filtriranog efluenta mjerene tijekom pokusa na kraju anaerobne i aerobne faze pri različitim vrijednostima KPK influenta.



**Slika 5.** Koncentracija KPK u filtriranom efluentu na kraju aerobne i anaerobne faze kod različitih KPK vrijednosti influenta označenih zeleno

Na početku uzgoja kod KPK vrijednosti influenta  $619\text{ mgO}_2L^{-1}$  s vremenom je uočen pad KPK nakon aerobne faze što je moglo ukazati na povećanje količine mikroorganizama koji

troše organsku tvar, tj. povećanje količine aktivnog mulja ili njihovu prilagodbu na novi oblik supstrata. Niska vrijednost otopljenog KPK nakon aerobne faze vidljiva je i kod KPK influenta od  $924 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ , no od 14. do 35. dana (KPK vrijednosti influenta 924, 1336 i  $987 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ ) primijećeno je povećanje razlike u vrijednostima KPK efluenta na kraju anaerobne i aerobne faze što je dalo ukazati na mogućnost prisustva većeg udjela organizama koji asimiliraju organsku tvar aerobno u aktivnom mulju. Moglo se zaključiti kako je povećanje KPK influenta sa 619 na  $1336 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  unutar prvih 28 dana, nepovoljno utjecalo na aktivnost PAO-a u mulju u kojem su počeli prevladavati organizmi koji troše organsku tvar aerobno, a ne anaerobno što je karakteristika PAO. Zbog toga, od 28. do 42. dana postupno je snižavana KPK vrijednost influenta te se dao primijetiti pad KPK vrijednosti efluenta na kraju anaerobne faze tijekom dovođenja oba influenata ( $987$  i  $616 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ ). Također, znatno je smanjena i razlika KPK efluenta na kraju anaerobne i aerobne faze što je dalo ukazati na ponovno povećanje aktivnosti PAO-a u aktivnom mulju. Takvom mulju, obogaćenom PAO-ima postupno se povećavala KPK vrijednost influenta od 981 do  $1815 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ . Uočeno je kako se s vremenom, kod svakog od influenata, smanjivala KPK vrijednost efluenta na kraju anaerobne faze kao i razlika KPK efluenta na kraju aerobne i anaerobne faze. Moglo se zaključiti kako je s promjenom influenta bilo potrebno neko vrijeme kako bi se postojeći PAO-i prilagodili na novo okruženje i razmnožili. Moglo se uočiti kako su vrijednosti KPK efluenta na kraju anaerobne i aerobne faze bile približno slične tijekom povećanja KPK influenata od 981 do  $1815 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ . Time se dalo primijetiti da je aktivni mulj dovoljno stabilan da se prilagodi novim uvjetima, tj. povećanju acetata u vodi i da se razmnožio u količini dovoljnoj da može asimilirati unesene količine organske tvari u anaerobnoj fazi

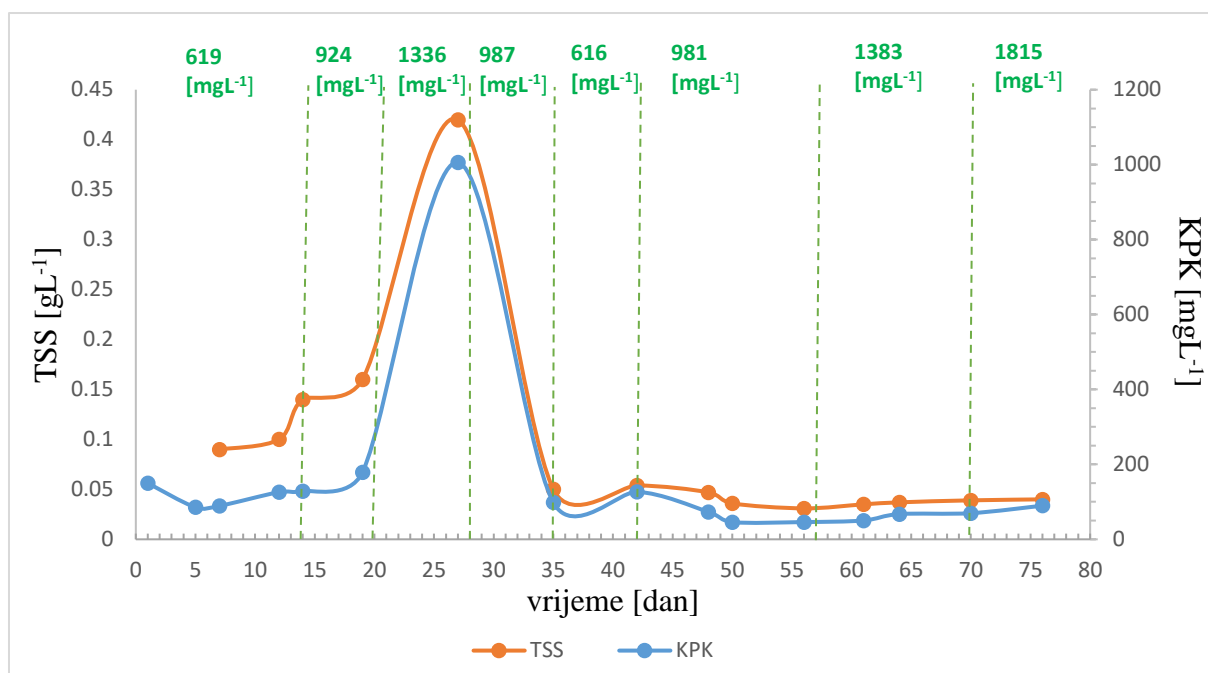
Narušavanje stabilnosti mulja povećanjem KPK influenta do 28. dana moglo se primijetiti i povećanjem KPK-a i TSS-a nefiltriranog efluenta (slika 6). TSS vrijednost predstavlja ukupnu suspendiranu tvar koja se dijeli na organski (VSS) i anorganski dio (ISS), a čine ga: aktivne žive bakterije, ostatci stanica odumrlih u procesu obrade, biološki nerazgradive organske suspendirane tvari iz otpadne vode i anorganske suspendirane tvari iz otpadne vode (Matošić, 2015). Prema tome TSS (i VSS) može biti dobar pokazatelj količine biomase. Treba uzeti u obzir da na TSS vrijednost ima utjecaj SRT, odnosno volumen viška mulja koji se odvodi iz sustava. Što je SRT veći to je i TSS vrijednost veća jer se manje mulja odvodi iz sustava, pa se više nakuplja (Matošić, 2015). SRT vrijednost izračunata je matematičkim modelom koji uzima u obzir da u sustavu koncentracija aktivnog mulja iznosi oko željenih  $4 \text{ gL}^{-1}$ . Ukupnu masu mulja u ovom slučaju čine žive stanice i ostatci mrtvih stanica, te

anorganske suspendirane tvari koje su u ovom slučaju ISS živih stanica što je izraženo jednadžbom prema Ekama i Wentzel (2008), prikazanoj u poglavlju 3.1.

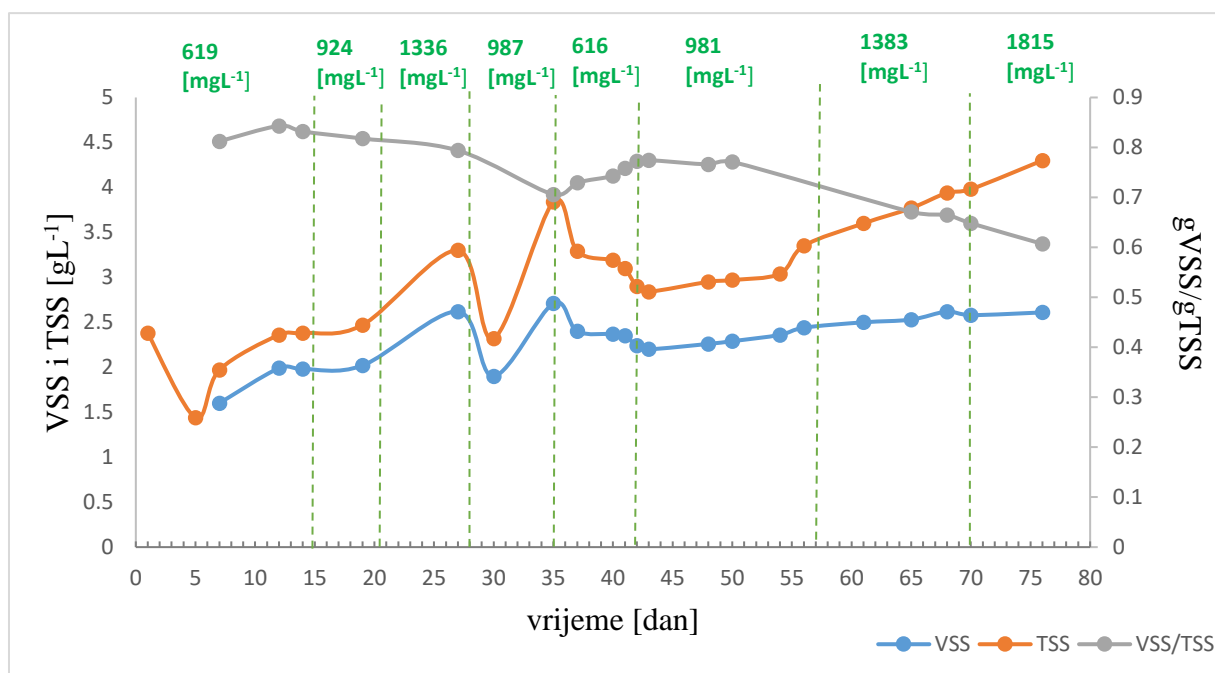
Kako bi se uzgojio i održao mulj u željenoj koncentraciji od  $4 \text{ gL}^{-1}$  bilo je potrebno pri početnoj koncentraciji KPK u influentu od  $600 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  prema već spomenutoj jednadžbi ukupne mase mulja odrediti odgovarajuću vrijednost SRT-a. Budući da je početni SRT od 47 dana (tablica 3) jako velik, postupno se povećavala koncentracija natrijeva acetata (KPK), a time se smanjivao i potrebni SRT za održavanje mulja koncentracije  $4 \text{ gL}^{-1}$ . Pri KPK koncentraciji influenta od 1400 i  $1800 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ , SRT vrijednost za održavanje mulja koncentracije  $4 \text{ gL}^{-1}$  iznosila je 14 i 10 dana što su vrijednosti pri kojima se provodi dobro uklanjanje fosfora.

Na početku TSS vrijednost efluenta bila je niska što je ukazalo na dobru taloživost mulja, zbog čega tijekom izbacivanja efluenta nije dolazilo i do istovremenog izbacivanja mulja. Nadalje, povećanjem KPK vrijednosti influenta dolazi i do povećanja TSS-a u nefiltriranom efluentu, što je ukazalo na smanjenu taloživost mulja. Smanjena taloživost mulja, pretpostavilo se, javila se zbog rasta drugih mikroorganizama, najviše nitastih bakterija. Također, uočen je i porast KPK nefiltriranog efluenta koji predstavlja organsku tvar TSS-a, ali i KPK otpadne vode zaostao nakon obrade. Nakon 35. dana uzgoja, kada je pretpostavljeno postojanje stabilnog mulja, TSS i KPK efluenta su se pokazali konstantnim. Iz toga se može zaključiti dobra taloživost mulja, te njegova dobra aktivnost jer se povećanjem KPK influenta nije povećavala KPK efluenta, tj. povećane koncentracije natrijeva acetata uspješno su uklonjene od strane mikroorganizama aktivnog mulja i to većinom u anaerobnoj fazi što ukazuje na prisutnost i aktivnost PAO.





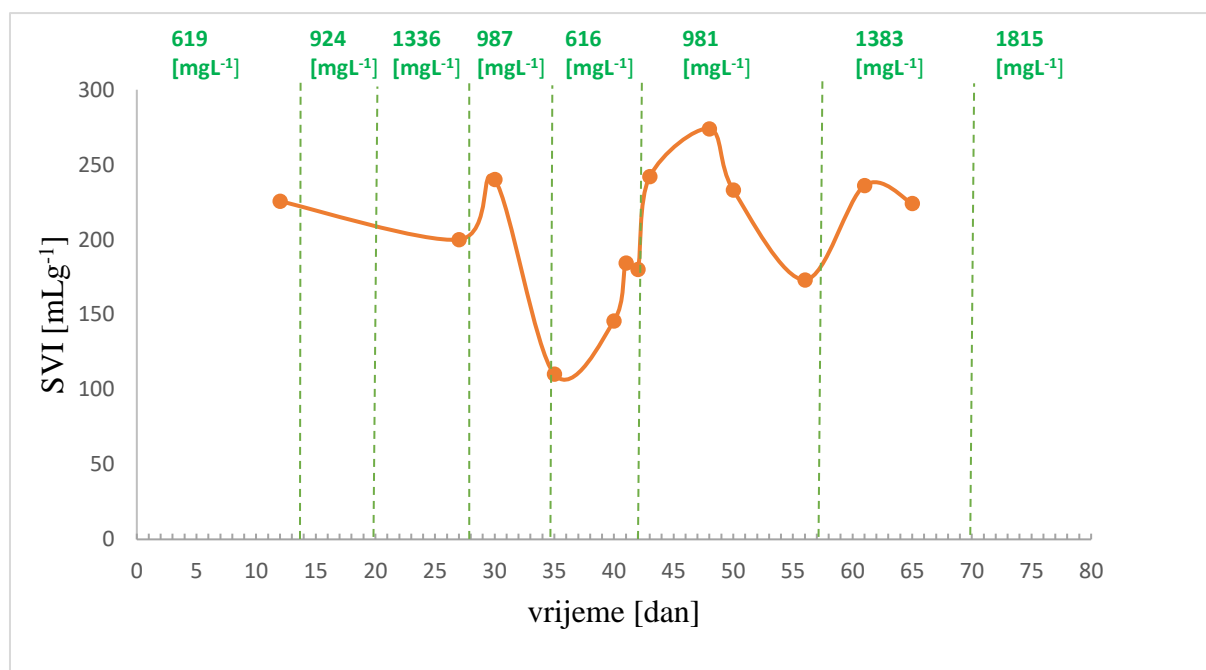
**Slika 6.** Koncentracija KPK i TSS u nefiltriranom efluentu kod različitih KPK vrijednosti influenta označenih zeleno



**Slika 7.** TSS, VSS i omjer  $\text{gVSS/gTSS}$  mulja kod različitih KPK vrijednosti influenta označenih zeleno

TSS je tijekom pokusa povećan od početnih  $2,4$  na  $4,3 \text{ gL}^{-1}$ , što je ukazalo na uspješan uzgoj bakterija aktivnog mulja u kojem je bio velik udio PAO što se može zaključiti iz značajne anaerobne potrošnje acetata. TSS vrijednost mulja unutar prvih 5 dana je očekivano pala.

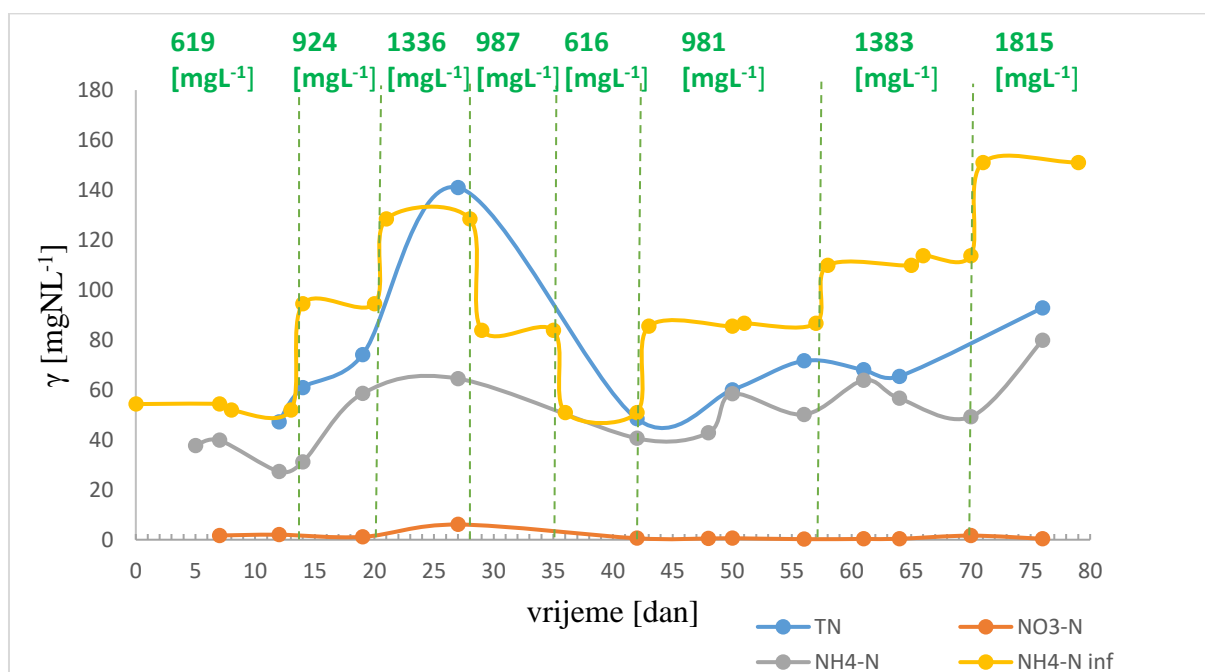
Razlog tome je izbacivanje suspendiranih tvari, koje su stigle iz uređaja za obradu otpadne vode, zajedno s viškom mulja. Nakon toga slijedio je rast TSS-a i VSS-a što je pokazatelj rasta biomase. Nakon 7. dana, tijekom korištenja influenta od 619 i 924  $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$  TSS i VSS vrijednosti bile su približno konstantne, što se vidi i iz omjera  $\text{gVSS/gTSS}$ , te su se kretale od 1,97 do 2,47  $\text{gL}^{-1}$  za TSS i od 1,6 do 2,02  $\text{gL}^{-1}$  za VSS. Nakon toga slijedio je pad TSS-a i VSS-a, pretpostavlja se zbog povećanog TSS-a efluenta koji je izlazio iz sustava i koji je vidljiv na slici 6. Povećanjem KPK influenta dolazi do povećanja koncentracije biomase, stoga je SRT smanjivan, odnosno povećava se volumen viška mulja da bi koncentracija biomase ostale približno stalna (tablica 3). Od 35. dana pa nadalje, kada je smanjenjem ulaznog KPK stabiliziran mulj, primijećen je rast TSS-a i VSS-a mulja. S druge strane, omjer  $\text{gVSS/gTSS}$  je padao sve do 0,6. Relativno nizak omjer  $\text{gVSS/gTSS}$  javlja se kod uspješnih EBPR procesa, gdje je omjer  $\text{gVSS/gTSS}$  u prosjeku od 0,72 do 0,73 (Wenzel i sur., 2008). Smanjenje omjera VSS/TSS javlja se zbog povećanja anorganskog dijela TSS-a, u ovom slučaju to je akumulirani poli-P.



**Slika 8.** SVI mulja kod različitih KPK vrijednosti influenta označenih zeleno

Na slici 8 prikazani su rezultati određivanja SVI tijekom pokusa. SVI je mjera taloživosti mulja. Ukoliko je SVI nizak, odnosno taloživost mulja dobra, izdvajanje mulja će biti jednostavnije, a time će proces obrade biti uspješniji. Danas se SVI mulja iznad  $120 \text{ mLg}^{-1}$  smatra slabo taloživim muljem (Henze i sur., 2008). Tijekom određivanja SVI treba uzeti u

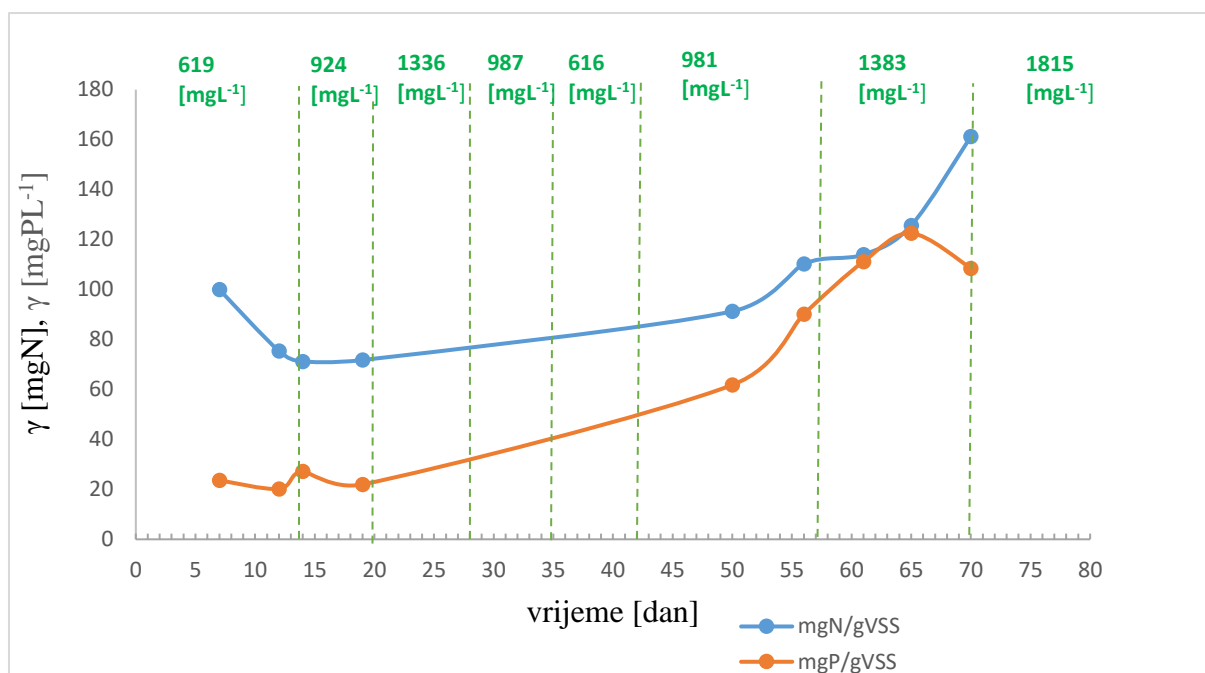
obzir određene probleme. Pri visokim koncentracijama mulja, izmjerene vrijednosti SVI mogu znatno odstupati, te je također utvrđeno je da na mjerenja SVI djeluju dimenzije posude za taloženje (van Loosdrecht i sur., 2016). Tijekom pokusa SVI vrijednost je značajno varirala od 110 do 274 mLg<sup>-1</sup>. Međutim, taloženje mulja u izvođenju pokusa uglavnom je bilo zadovoljavajuće. Premda je 27. dana uzgoja TSS efluenta porastao (slika 6), SVI se nije značajno promijenio. Pretpostavlja se da je pojava nitastih bakterija uzrokovala mutnoću u supernatantu prilikom taloženja (koja se teško taloži i izlazi van s efluentom), dok je većina mulja ostala u flokulama i zadovoljavajuće se taložila. S obzirom da se koristila sintetička otpadna voda u kojoj su bili otopljeni nutrijenti, očekivano je da će SVI biti viši nego u postrojenjima za obradu otpadnih voda u kojima zajedno s otpadnom vodom dolaze i druge nečistoće koje omogućavaju mikroorganizmima da se nakupljaju u flokule i time lakše talože.



**Slika 9.** Koncentracija ukupnog dušika (TN), amonijaka i nitrata u efluentu, te amonijaka u influentu kod različitih KPK vrijednosti influenta označenih zeleno

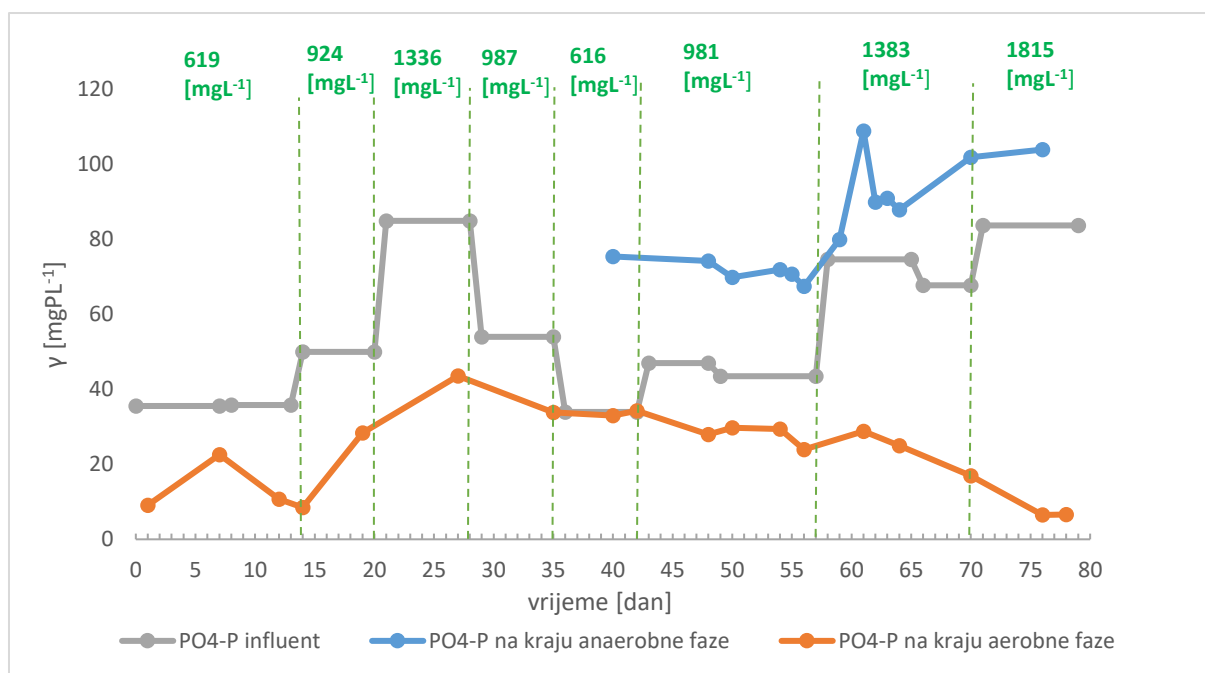
Tijekom pokusa u efluentu je određivan dušik u obliku ukupnog dušika, nitrata i amonijaka. Amonijak je služio kao izvor dušika za rast biomase i dodavan je u influent u obliku amonijeva klorida. Na slici 9 prikazana je koncentracija amonijaka tijekom čitavog pokusa koja je bila u suvišku što znači da su potrebe mikroorganizama za N bile zadovoljene. Moglo se uočiti kako je koncentracija amonijaka rasla sukladno povećanju KPK influenta, jer se koncentracija amonijeva klorida proporcionalno povećavala povećanjem KPK influenta. Isto tako može se uočiti kako je tijekom korištenja pojedinih influenata (619, 981 i 1383 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>),

koncentracija amonijaka u efluentu prvo porasla pa je snižena. Pretpostavilo se da je razlog tome prilagodba mulja na novo okruženje pri čemu troši manje količine amonijaka (rast koncentracije amonijaka u efluentu), nakon čega se mulj razmnožava i troši više amonijaka. To se može povezati s povećanjem TSS (VSS) tijekom korištenja navedenih influenata. Na slici 9 prikazana je i koncentracija ukupnog dušika (TN) u efluentu. Ukupni dušik u efluentu je 27. dana znatno porastao što se može objasniti povećanjem koncentracije amonijeva klorida u influentu ili, što je vjerojatnije, pojavom mulja u efluentu koji sadrži velik udio dušika. Također, tijekom ostatka pokusa primijećen je porast TN efluenta s povećanjem KPK influenta, ali nakon 35. dana može uočiti pad koncentracije TN efluenta u usporedbi s koncentracijom TN efluenta do 28. dana. Usprkos povećanju TSS efluenta, pojava visoke koncentracije TN efluenta pri korištenju influenta od  $1336 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  u odnosu na nisku koncentraciju TN efluenta kod influenta KPK vrijednosti  $1383 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  dovodi do pretpostavke da je nakon 35. dana uspostavljen stabilan mulj koji troši značajne količine dušika za svoj rast. Tu pretpostavku potvrđuje prethodna pretpostavka o trošenju amonijeva klorida kao i povećanje udjela dušika u VSS-u mulja (slika 10). Prisustvo amonijaka u aerobnoj fazi EBPR-a potiče rast nitrificirajućih organizama koji oksidiraju amonijak do nitrata i nitrita. Dostupnost nitrata i nitrita u anaerobnoj fazi smatra se štetnim za EBPR proces jer omogućuje rast heterotrofnih denitrificirajućih organizama koji konkuriraju PAO-ima za izvor ugljika (van Loosdrecht i sur., 2016) u anaerobnoj fazi. Stoga je tijekom pokusa svakodnevno dodavan ATU koji djeluje inhibirajuće na rast i metabolizam nitrificirajućih bakterija. Koncentracija nitrata u efluentu kretala se u rasponu od  $0,217$  do  $6,07 \text{ mgNL}^{-1}$  s prosječnom vrijednosti od  $1,29 \text{ mgNL}^{-1}$ , što potvrđuje da gotovo nije bilo nitrifikacije. Takva niska koncentracija nitrata onemogućila je pojavu denitrifikacije u anaerobnoj fazi i omogućila PAO-ima da asimiliraju acetat bez konkurencije denitrificirajućih bakterija.



**Slika 10.** Udio dušika i fosfora u VSS-u mulja kod različitih KPK vrijednosti influenta označenih zeleno

Na slici 10 prikazan je udio dušika i fosfora u VSS-u mulja. PAO-i su mikroorganizmi koji imaju sposobnost nakupljanja velike količine fosfora i do  $0,35-0,38 \text{ gP(gVSS)}^{-1}$ , za razliku od OHO koji nakupljaju oko  $0,03 \text{ gP(gVSS)}^{-1}$  (Wenzel i sur., 2008). U prvih 20 dana pokusa udio fosfora u mulju je bio nizak što je očekivano s obzirom na adaptaciju mulja. Nakon 50. dana uzgoja uočen značajan rast udjela fosfata koji ukazuje na povećanje udjela PAO-a u ukupnom mulju što potvrđuje već opisane rezultate potrošnje acetata u anaerobnoj fazi. Bez povećanja udjela fosfora u biomasi, potrošnja acetata u anaerobnoj fazi mogla bi se pripisati i GAO-ima, ali povećanje udjela fosfora u mulju jasno ukazuje na prisutnost PAO. Ne postoji pretpostavka koja objašnjava pad udjela fosfata 70. dan uzgoja. Prema literaturi, količina dušika u aktivnom mulju u prosjeku iznosi  $0,1 \text{ mgN(mgVSS)}^{-1}$  (Henze i sur., 2008). Tijekom pokusa udio dušika u VSS-u kretao se u rasponu od 71,2 do  $161,2 \text{ mgN(gVSS)}^{-1}$ . U početku je udio dušika padao povećanjem KPK influenta, pretpostavlja se zbog prilagodbe mulja koji je u manjoj mjeri koristio izvor dušika za rast. Udio dušika je s vremenom povećan na konačnih  $161,2 \text{ mgN(gVSS)}^{-1}$  što je visok udio prema literaturi.



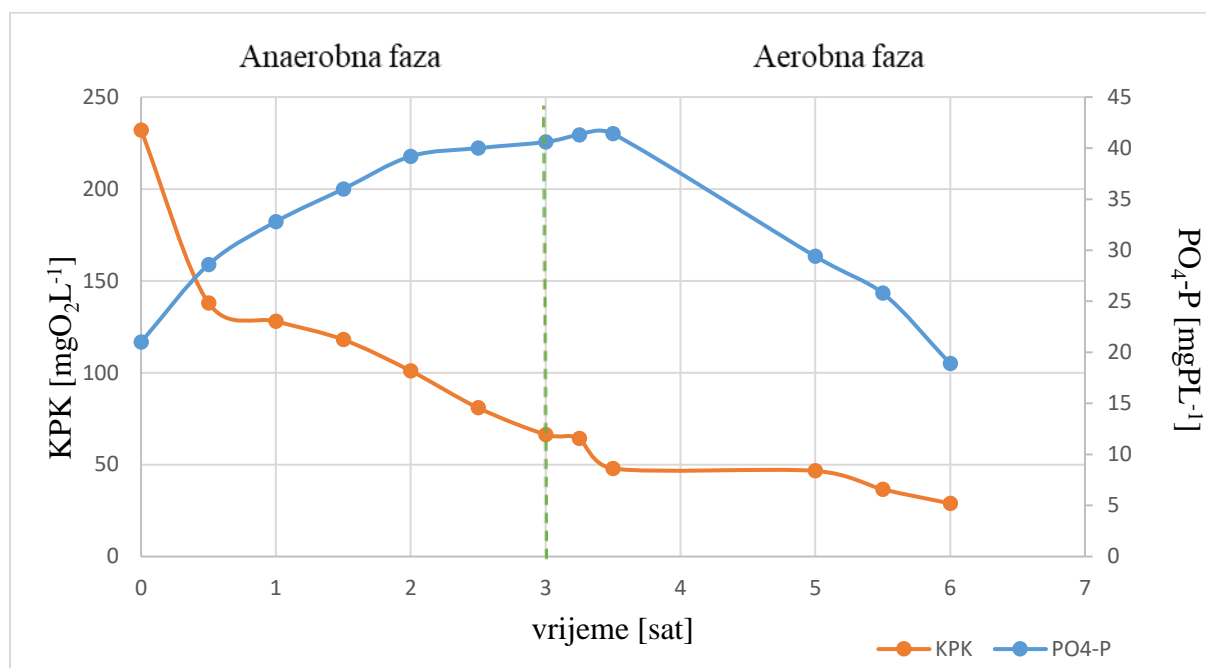
**Slika 11.** Koncentracija fosfata na kraju aerobne i anaerobne faze kod različitih KPK vrijednosti influenta označenih zeleno

Slika 11 prikazuje koncentraciju fosfata u influentu i potrošnju fosfata na kraju aerobne i anaerobne faze. Na početku uzgoja praćena je koncentracija fosfata na kraju ciklusa, tj. nakon aerobne faze. Pokazalo se da postoji uklanjanje fosfata jer je koncentracija fosfata u influentu veća od one na kraju ciklusa. Od 36. do 42. dana, razlika koncentracije fosfata influenta i efluenta je jako mala. Može se zaključiti da je uklanjanje fosfora bilo prilično slabo što se vidi kao neto uklonjeni fosfor na slici 16. Nakon 40. dana praćena je i koncentracija fosfata na kraju anaerobne faze. Primijećen je rast koncentracije fosfata na kraju anaerobne faze, te smanjenje na kraju aerobne. Takav rezultat upućuje da je povećan udio PAO-a u aktivnom mulju, te da su prisutni PAO-i povećavali svoje zalihe unutarstaničnih poli-P te na taj način uklanjali fosfor iz vode. Potvrdu na tu pretpostavku može se naći i u uočenom porastu neto uklonjenog fosfata (slika 16).

#### 4.1 Testiranja aktivnosti PAO-a

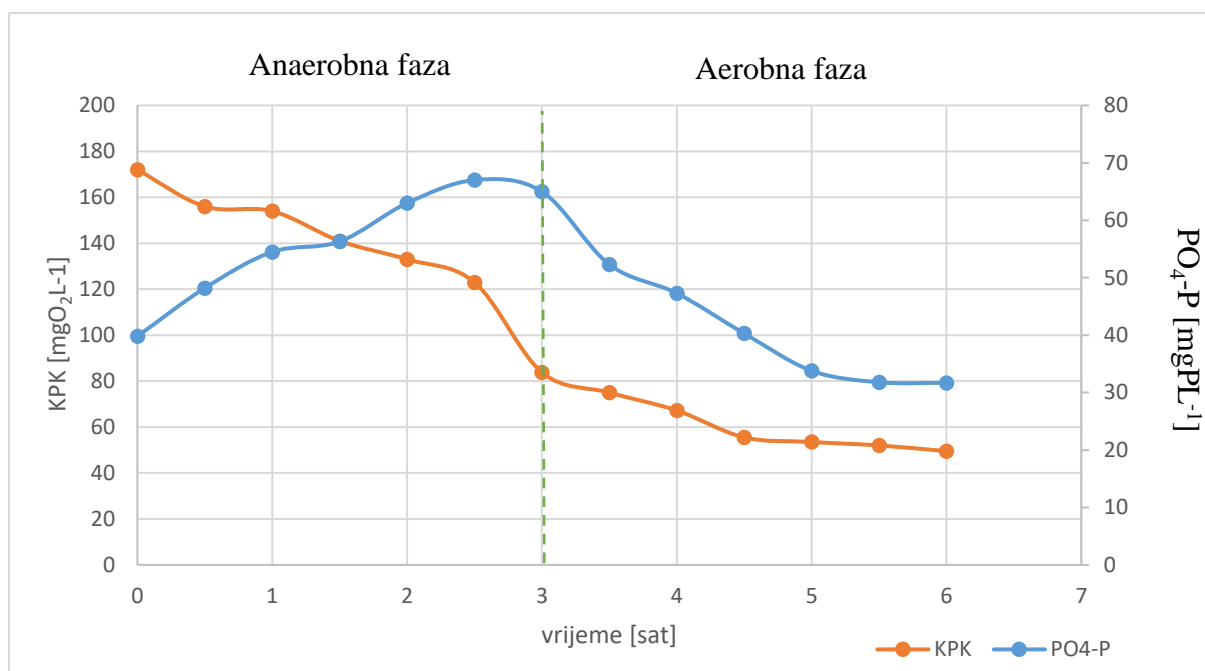
Kako bi se dokazala prisutnost PAO-a u aktivnom mulju i kako bi se analizirala njihova aktivnost, provedena su testiranja biološke aktivnosti PAO-a. Testiranjem je određivana koncentracija otpuštenog i utrošenog fosfata (neto vezanje fosfora), te koncentracija asimiliranog KPK. Provedeno je devet testiranja kod različitih KPK vrijednosti influenta, a rezultati nekih od njih prikazani su na slikama od 12 do 15. Konačni rezultati svih testova

biološke aktivnosti prikazani su na slici 16. Testiranje se provodilo na način da bi se 250 mL influenta dodalo ručno u reaktor, cijeli volumen odjednom. Težilo se da početna KPK vrijednost bude oko  $200 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ .



**Slika 12.** Rezultati testiranja biološke aktivnosti PAO 8. dana uzgoja

Prvo testiranje (slika 12) provedeno je 8. dana uzgoja kada je korišten influent od  $619 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ . Na slici se može uočiti tijek oslobađanja i asimilacije fosfata, te asimilacije KPK specifičan za EBPR proces. Fosfati su u početku otpušteni zatim ponovo asimilirani. KPK vrijednost u anaerobnom dijelu znatno se brže trošila nego u aerobnom dijelu. Takav opis odgovara metabolizmu PAO-a, time ovo testiranje upućuje na postojanje PAO-a u aktivnom mulju već 8. dana pokusa što pokazuje i da je početni aktivni mulj sadržavao određeni broj PAO-a. Isto tako, uočeno je da je početna koncentracija fosfata viša od konačne, a to znači da su PAO-i asimilirali fosfor i uklonili ga iz sustava.

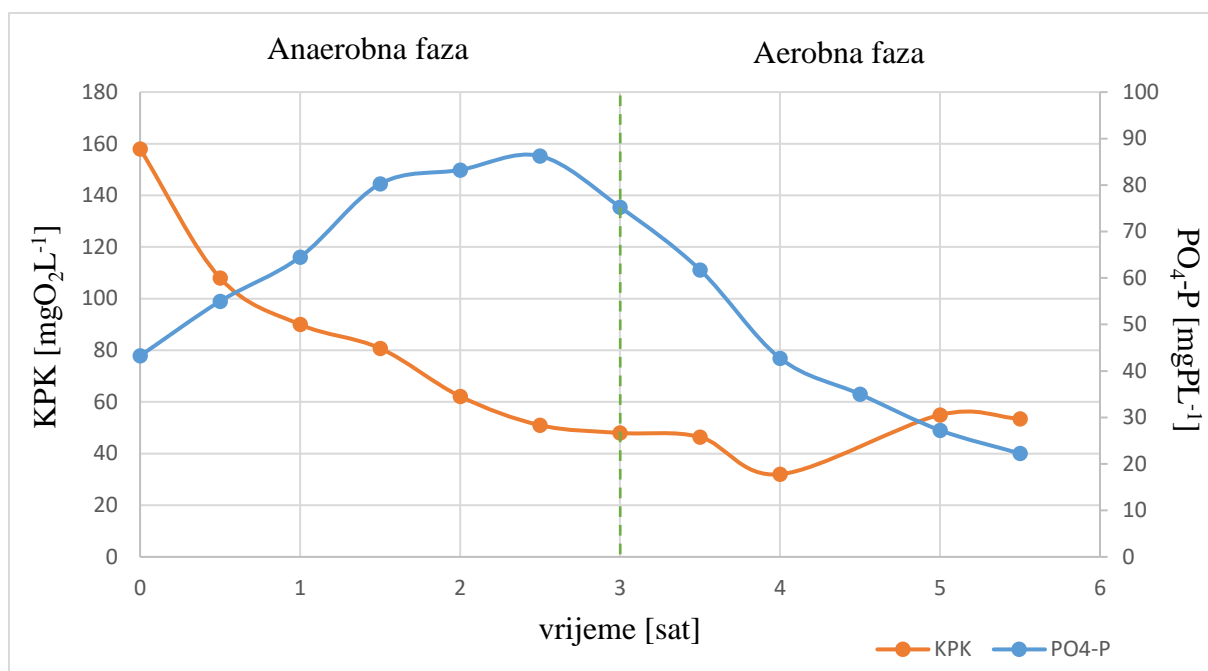


**Slika 13.** Rezultati testiranja biološke aktivnosti PAO 35. dana uzgoja

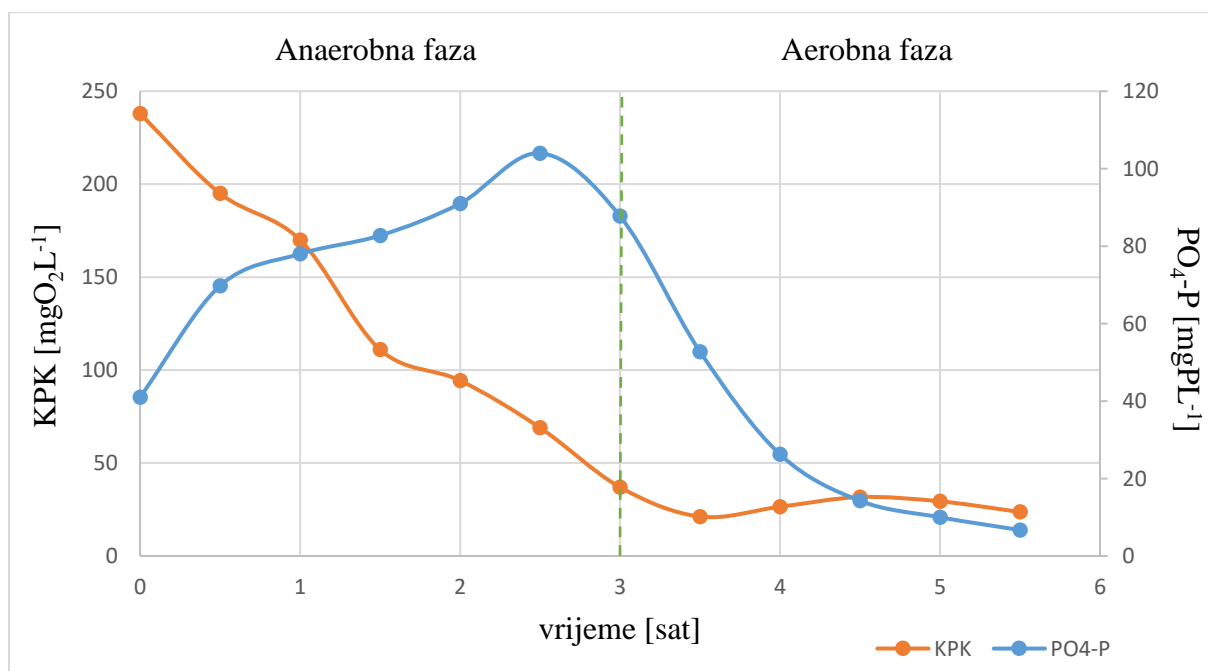
Slika 13 prikazuje testiranje 35. dana uzgoja pri KPK vrijednosti influenta  $987 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ . Testiranje je provedeno neposredno nakon što je pretpostavljeno narušavanje stabilnosti mulja povećanjem KPK influenta. Prema rezultatima, zaključeno je da su PAO-i i dalje prisutni u sustavu.

Sljedeće dvije slike (slika 14 i slika 15) prikazuju testiranja 68. i 76. dana uzgoja pri KPK vrijednostima influenta od  $1404 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  i  $1815 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ . S obzirom na uočene promjene koncentracije fosfata i KPK tijekom testiranja zaključeno je da su PAO-i i dalje prisutni u mulju. Ono što je također uočeno je niska koncentracija fosfata na kraju ciklusa iako su početne koncentracije visoke. To je dovelo do zaključka da mulj ima dobru aktivnost i da je bogat PAO-ima. Na kraju ciklusa uočen je blagi porast KPK. Pretpostavljeno je da je došlo do odumiranja i raspadanja stanica pri čemu je unutarnji sadržaj stanica otpušten u okolinu.

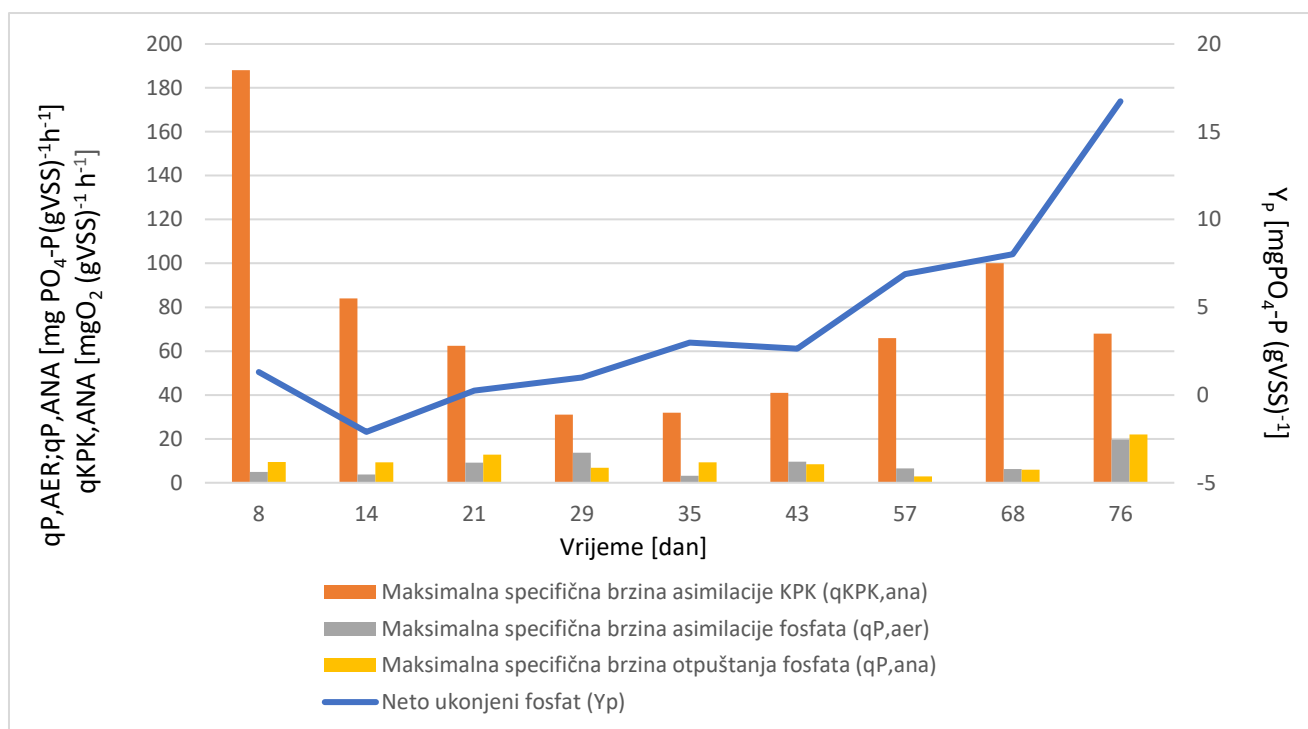




**Slika 14.** Rezultati testiranja biološke aktivnosti PAO 68. dana uzgoja



**Slika 15.** Rezultati testiranja biološke aktivnosti PAO 76. dana uzgoja



**Slika 16.** Maksimalne specifičnih brzina asimilacije KPK i otpuštanja fosfata, maksimalna specifična brzina asimilacije fosfata, količina neto uklonjenog fosfata u testiranjima biološke aktivnosti PAO-a pri različitim koncentracijama KPK

Na slici 16 prikazane su maksimalne specifične brzine asimilacije fosfata ( $q_{P,aer}$ ) i KPK ( $q_{KPK,ana}$ ) te otpuštanja fosfata ( $q_{P,ana}$ ) tijekom cijelog uzgoja mulja. Maksimalne specifične brzine asimilacije i otpuštanja fosfata bile su slične tijekom cijelog pokusa osim u posljednjim danima kada je uočen porast. Međutim, maksimalna specifična brzina asimilacije KPK značajno se mijenjala tijekom uzgoja. Primijećeno je smanjenje  $q_{KPK,ana}$  do 29. dana što se je rezultiralo povećanjem KPK u efluentu nakon anaerobne faze. Ovakav rezultat pridonio je pretpostavci o narušavanju stabilnosti mulja u kojem rastu organizmi koji aerobno troše KPK. Nakon 35. dana došlo je do povećanja  $q_{KPK,ana}$  što dovodi do zaključka da u mulju prevladavaju i razmnožavaju se organizmi koji anaerobno troše KPK, odnosno PAO-i.

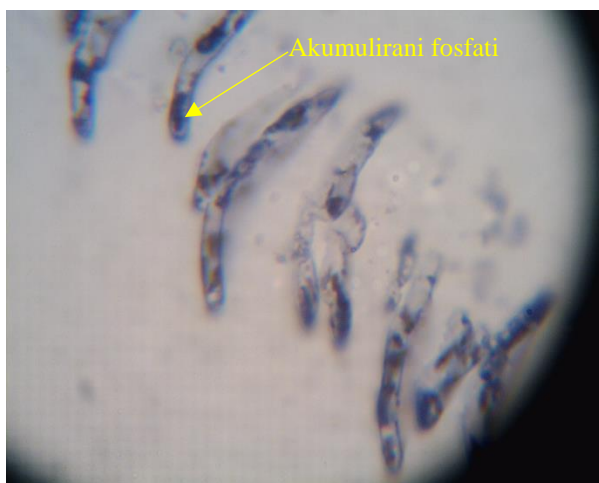
Za EBPR jedan od najvažnijih pokazatelja uspješnosti je neto uklonjeni fosfor. Na slici 16 prikazana je promjena neto uklonjenog fosfata tijekom cijelog pokusa. U prvih 29. dana, neto uklonjen fosfat bio je oko 0 mgPO<sub>4</sub>-P (gVSS)<sup>-1</sup> osim 14. dana kada je uočen pad prelaskom s KPK vrijednosti influenta 619 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup> na 924 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>. Nakon 35. dana kada je pretpostavljeno postojanje stabilnog mulja u kojem prevladavaju PAO-i uočen je rast neto uklonjenog fosfata. Time se potvrdilo da je postupnim povećanjem koncentracije acetata u

influentu moguće uzgojiti mulj s visokim udjelom PAO-a koji će uklanjati fosfor i pri vrlo visokim koncentracijama acetata.

Iz ovog pokusa može se zaključiti da visoke koncentracije organske tvari u influentu nisu imale negativan utjecaj na rast i aktivnost PAO-a ako im se omogući postupna prilagodba. Ključno je da se povećanjem koncentracije acetata ne dođe do prevelikog zaostatka acetata nakon anaerobne faze. Pretpostavlja se da upravo ovakav način vođenja obrade sintetičke otpadne vode s postupnom prilagodbom na više koncentracije acetata to omogućava. Osim toga, vođenje procesa u kratkim ciklusima od 6 h uz obročno dovodenje influenta tijekom dana smanjuje opterećenje sustava organskom tvari. Na taj se način dovodi količina acetata koju PAO-i mogu potrošiti anaerobnoj fazi i time spriječi zaostajanje veće količine acetata u aerobnoj fazi koja se onda prenosi u slijedeći ciklus. Međutim, ostaje pitanje utjecaja iste količine acetata na aktivnost PAO-a, ako bi se vrijeme ciklusa produljilo. Produljenje vremena ciklusa značilo bi smanjenje broja ciklusa, a time povećanje koncentracije acetata. Tada bi isti mulj s istim dnevnim opterećenjem organskom tvari morao trošiti veću količinu acetata ili bi došlo do nakupljanja acetata u anaerobnoj fazi i njihove potrošnje u aerobnoj fazi. Čini se da je upravo ovaj fenomen ključan za zadržavanje aktivnosti PAO-a.

#### **4.2 Mikroskopiranje aktivnog mulja**

Za utvrđivanje prisutnosti PAO-a vrlo se često koriste mikroskopske metode poput bojanja po Gramu i Neisseru. U aktivnom mulju se nalaze brojni mikroorganizmi sličnih morfoloških karakteristika zbog čega ih je vrlo teško identificirati, stoga se danas uz mikroskopske metode koriste i molekularne poput FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija). U ovom radu za dokazivanje prisutnosti PAO-a korištena je mikroskopska metoda bojanja po Neisseru pomoću koje je moguće otkrivanje prisutnosti akumuliranog unutarstaničnog poli-P.



**Slika 17.** Mikroskopska slika PAO-a

Na slici 17 nalazi se mikroskopska slika aktivnog mulja korištenog u pokusu. Vrlo se lako uočavaju tamne točke unutar duguljastih stanica koje predstavljaju unutarstanični poli-P. Time je dodatno potvrđena prisutnost PAO-a u aktivnom mulju.

## 5 ZAKLJUČCI

1. PAO u aktivnom mulju ne mogu se brzo prilagoditi visokim koncentracijama acetata u influentu sve dok se ne uzgoji aktivni mulj u kojem PAO prevladavaju.
2. Visoke koncentracije acetata u influentu nemaju negativni utjecaj na rast i aktivnost PAO-a ako se proces obrade vode provodi u kratkim ciklusima u trajanju od 6 h i ako mulj sadrži dovoljno PAO-a koji mogu potrošiti dodani acetat već u anaerobnoj fazi.
3. Postupno povećavanje koncentracije acetata pri biološkom uklanjanju fosfora vođenom u kratkim ciklusima od 6 h dovodi do povećanja udjela PAO-a u aktivnom mulju i uklanjanja fosfata.

## 6 LITERATURA

Arvin, E., Kristensen, G. H. (1985) Exchange of organics, phosphate and cations between sludge and water in biological phosphorus and nitrogen removal processes. *Water. Sci. Technol.* **17**(11/12), 147-162.

Baetens, D. (2000) *Enhanced biological phosphorus removal: modelling and experimental design*. Ph. D., Ghent University, Belgium.

Barker, P. S., Dold, P. L. (1996) Denitrification behaviour in biological excess phosphorus removal activated sludge systems. *Water. Res.*, **30**(4), 769-780.

Barnard, J. L. (1976) A review of biological phosphorus removal in the activated sludge process. *Water SA* **2**(3), 126-144.

Benammar, L., Menasria, T., Ayachi, A., Benounis, M. (2015) Phosphate removal using aerobic bacterial consortium and pure cultures isolated from activated sludge. *Process Saf. Environ.* **95**, 237-246.

Brdjanovic, D., Slamet, A., van Loosdrecht, M. C. M., Hooijmans, C. M., Alaerts, G. J., Heijnen, J. J. (1998) Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water. Res.* **32**(1), 200-208.

Carvalheira, M., Oehmen, A., Carvalho, G., Reis, M. A. M. (2014a) The effect of substrate competition on the metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water. Res.* **64**, 149-159.

Carvalheira, M., Oehmen, A., Carvalho G., Eusebio, M., Reis, M. A. M. (2014b) The impact of aeration on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water. Res.* **66**, 296-307.

Comeau, Y., Hall, K., Hancock, R., Oldham, W. (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water. Res.* **20**(12), 1511-1521.

Comeau, Y., Oldham, W.K., Hall, K. J. (1987) Dynamics of carbon reserves in biological dephosphation of wastewater. U: *Biological Phosphate Removal from Wastewaters* (Ramadori, R., ured.), Pergamon, Oxford, str. 39-55.

Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P. L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackall L. L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microb.* **66**(3), 1175-1182.

- Dai, Y., Yuan, Z., Wang, X., Oehmen, A., Keller, J. (2007) Anaerobic metabolism of *Defluviicoccus vanus* related glycogen accumulating organisms (GAOs) with acetate and propionate as carbon sources. *Water. Res.* **41** (9), 1885-1896.
- Ekama, G.A., Wentzel, M.C. (2008) Organic Matter Removal. U: *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design* (Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama. G., Brdanovic. D., ured.), IWA Publishing, London, str. 53-87.
- Erdal, U. G., Erdal, Z. K., Randall, C. W. (2003) The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance. *Water Sci. Technol.* **47**(11), 1-8.
- Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001a) Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs. *Biotechnol. Bioeng.* **76** (1), 32-43.
- Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001b) pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms. *Water Environ. Res.* **73**(2), 223-232.
- Filipović, A. (2018) *Utjecaj natrijeva acetata na rast mikroorganizama koji akumuliraju fosfor iz otpadne vode*. diplomski rad, PBF, Zagreb.
- Fuhs, G. W., Chen, M. (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for treatment of wastewater. *Microb. Ecol.* **2**(2), 119-138.
- Ginige, M. P., Kayaalp, A. S., Cheng, K. Y., Wylie, J., Kaksonen, A. H. (2013) Biological phosphorus and nitrogen removal in sequencing batch reactors: effects of cycle length, dissolved oxygen concentration and influent particulate matter. *Water Sci. Technol.* **68** (5), 982-990.
- Glancer-Šoljan, M., Landeka Dragičević, T., Šoljan V., Ban, S. (2001) Biološka obrada otpadnih voda, Interna skripta PBF, Zagreb.
- Goel, R. K., Motlagh, A. M. (2014) *Biological Phosphorus Removal. Comprehensive Water Quality and Purification*, Elsevier Inc., Waltham, str. 150-162.
- Grady, C. P. L., Daigger, G. T. and Lim, H. C. (1999) *Biological wastewater treatment*, 2. izd., Marcel Dekker Inc., New York.

- Harper, D. (1992) *Eutrophication of freshwaters*, Chapman & Hall, London.
- Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdanovic, D., (2008) *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*, IWA Publishing, London.
- Hesseltmann, R. P. X., Fleischmann, T., Hany, R., Zehnder, A. J. B. (1999) Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods. *J. Microbiol. Meth.* **35**, 111-119.
- Janssen, P. M. J., Meinema, K., van der Roest, H. F. (2002) *Biological Phosphorus Removal: Manual for Design and Operation*, IWA Publishing, London.
- Kang, D.W., Noguera D. R (2014) *Candidatus Accumulibacter phosphatis*: Elusive Bacterium Responsible for Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR). *J. Environ. Eng.* **140**(1), 2-10.
- Kawaharasaki, M., Tanaka, H., Kanagawa, T., Nakamura, K. (1999) *In situ* identification of polyphosphate accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate probing concentration. *Water. Res.* **33**(1), 257-265.
- Kim, D. S., Jung, N. S, Park, Y. S. (2008) Characteristics of nitrogen and phosphorus removal in SBR and SBBR with different ammonium loading rates. *Korean J. Chem. Eng.* **25**(4), 793-800.
- Kong, Y., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2004) Microautoradiographic study of Rhodocyclus-related polyphosphate-accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microb.* **70**(9), 5383-5390.
- Kong, Y., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2005) Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microb.* **71**(7), 4076-4085.
- Kristiansen, R., Nguyen, H. T. T., Saunders, A. M., Nielsen, J. L., Wimmer, R., Le, V. Q., McIlroy, S. J., Petrovski, S., Seviour, R. J., Calteau, A. (2012) A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal. *ISME J.* **7**(3), 543-554.



Lanham, A. B., Oehmen, A., Saunders, A. M., Carvalho, G., Nielsen, P. H., Reis, M. A. (2013) Metabolic versatility in full-scale wastewater treatment plants performing enhanced biological phosphorus removal. *Water. Res.* **47**(19), 7032-7041.

Liu, W. T. (1995) *Function, dynamics and diversity of microbial population in anaerobic aerobic activated sludge processes for biological phosphate removal*. Ph.D., University of Tokyo, Japan.

Lopez-Vazquez, C. M., Oehmen, A., Hooijmans, C. M., Brdjanovic, D., Gijzen, H. J., Yuan, Z., van Loosdrecht, M. C. M., (2009) Modeling the PAO-GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature. *Water Res.* **43** (2), 450-462.

Malnou, D., Meganck, M., Faup, G. M., du Rostu, M. (1984) Biological phosphorus removal: study of the main parameters. *Water Sci. Technol.* **16**(10/11), 173-185.

Matošić, M. (2015) Membranski bioreaktori u zaštiti okoliša, Interna skripta PBF, Zagreb.

Mc Laren, A. R., Wood, R. L. (1976) Effective phosphorus removal from sewage by biological means. *Water SA*, **2**(1), 47-50.

Mino, T., Arun, V., Tsuzuki, Y., Matsuo, T. (1987) Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. U: *Biological phosphate removal from wastewaters* (Ramadori, R., ured.), Pergamon, Oxford, str. 27-38.

Mino, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. Review paper. *Water Res.* **32**(11), 3193-3207.

Moore, G. T. (2009) Nutrient control design manual, United States Environmental Protection Agency, Washington.

Morse, G. K., Lester, J. N., Perry, R. (1993) *The economic and environmental impact of phosphorus removal from wastewater in the European Community*, Selper Ltd., London.

Mudaly, D. D., Atkinson, B. W., Bux, F. (2000) Microbial community profile of a biological excess phosphorus removal (BEPR) activated sludge system using a cultivation independent approach. *Water SA* **26**(3), 343-352.

Nguyen, H. T. T., Le, V. Q., Hansen, A. A., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2011) High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **76**(2), 256-267.

- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L. L., Keller, J. (2005a) Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **91** (2), 162-168.
- Oehmen, A., Vives, M. T., Lu, H., Yuan, Z., Keller, J. (2005b). The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Res.* **39** (15), 3727–3737.
- Oehmen A., Lemos P. C., Carvalho G., Yuan Z., Keller J., Blackall L. L., Reis M. A. M. (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res.* **41**(11), 2271-2300.
- Pattarkine, V. M., Randall, C. W. (1999) The Requirement of Metal Cations for Enhanced Biological Phosphorus Removal by Activated Sludge. *Water Sci. Technol.* **40**(2),159-65.
- Panswad, T., Dounghai, A., Anotai J. (2003) Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system. *Water Res.* **37**(2), 409-415.
- Pijuan, M., Oehmen, A., Baeza, J. A., Casas, C., Yuan, Z. (2008) Characterizing the biochemical activity of full-scale enhanced biological phosphorus removal systems: A comparison with metabolic models. *Biotechnol. Bioeng.* **99**(1), 170-179.
- Randall, C. W., Barnard, J. L., Stensel, H. D. (1992) *Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal*, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, str. 25-78.
- Randall, C. W., Chapin, R. W. (1997) Acetic acid inhibition of biological phosphorus removal. *Water Environ. Res.* **69**(5), 955-960.
- Rodrigo, M. A., Seco, A., Ferrer, J., Peña-Roja, J. M. (1999) The effect of the sludge age on the deterioration of the enhanced biological phosphorus removal process. *Environ. Technol.* **20**(10), 1055-1063.
- Schönborn, C., Bauer, H. D., Röske, I. (2001) Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules. *Water Res.* **35**(13), 3190-96.
- Schuler, A. J., Jenkins, D. (2002) Effects of pH on enhanced biological phosphorus removal metabolisms. *Water Sci. Technol.* **46**(4–5), 171–78.
- Serafim, L. S. , Lemos, P. C. , Reis, M. A. M. (2002) Effect of pH control on EBPR stability and efficiency. *Water Sci. Technol.* **46** (4–5), 179–184.

- Seviour, R. J., Mino T., Onuki, M. (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 99-127.
- Smolders, G. J. F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorous removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotech. Bioeng.* **43**, 461-470.
- Tandoi, V., Majone, M., May, J., Ramadori, R. (1998) The behaviour of polyphosphate accumulating *Acinetobacter* isolates in an anaerobic-aerobic chemostat. *Wat. Res.* **32**(10), 2903-2912.
- van Loosdrecht, M. C. M., Nielsen, P. H., Lopez-Vazquez, C. M., Brdjanovic, D. (2016) *Experimental Methods in Wastewater Treatment*, IWA Publishing, London.
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K. H. (1994) Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(3), 792-800.
- Wentzel, M., Lötter, L., Loewenthal, R., Marais, G. (1986) Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal - a biochemical model. *Water SA* **12**(4), 209-224.
- Wentzel, M. C., Comeau, Y., Ekama, G., van Loosdrecht, C. M., Brdjanovic, D., (2008) Enhanced Biological Phosphorus Removal. U: *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing, London.
- Whang, L. M., Park, J. K. (2006) Competition between polyphosphate- and glycogen accumulating organisms in enhanced-biological-phosphorus-removal systems: Effect of temperature and sludge age. *Water Environ. Res.* **78**, 4-11.
- Whang, L. M., Filipe, C. D. M., Park, J. K. (2007) Model-based evaluation of competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms. *Water Res.* **41**(6), 1312-24.
- Wimawalansa, S. A., Wimawalansa, J. S. (2015) Protection of Watersheds, and Control and Responsible use of Fertiliser to Prevent Phosphate Eutrophication of Reservoirs. *IJRES* **1**(2), 1-18.
- Yeoman, S., Stephenson, T., Lester, J. N., Perry, R. (1988) The removal of phosphorus during wastewater treatment. *Environ. Poll.* **49**, 183-233.

- Yuan, Z., Pratt, S., Batstone, D. J. (2012) Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes. *Curr. Opin. Biotech.* **23**(6), 878-883.
- Zhang, T., Liu, Y., Fang, H. H. P. (2005) Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process. *Biotech. Bioeng.* **92**(2), 173-182.
- Zheng, X., Sun, P., Han, J., Song, Y., Hu, Z., Fan, H., Lv, S. (2014) Inhibitory factors affecting the process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) – A mini-review. *Process Biochem.* **49**, 2207-2213.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R. J., Yuan, Z. (2009) Involvement of the TCA cycle in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water Res.* **43**(5), 1330-1340.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Oehmen, A., Yuan, Z. (2010) The source of reducing power in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs)-A mini-review. *Water Sci. Tech.* **61**(7), 1653.